

SÉRIE A, N° 1038
N° D'ORDRE :
1875

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

D. BACH

PRÉPARATEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS
PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS
INSPECTEUR DES ÉTABLISSEMENTS CLASSÉS DE LA SEINE

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA NUTRITION AZOTÉE DE
L'*ASPERGILLUS REPENS* DE BARY.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS FAITES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **3 DEC** 1925 devant la Commission d'examen

MM. P. PORTIER . . . Président.
GUILLIERMOND . } Examineurs.
JAVILLIER . . . }

SAINT-DIZIER
ETABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

1925

SÉRIE A, N° 1038

N° D'ORDRE :

1875

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

D. BACH

PRÉPARATEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS

INSPECTEUR DES ÉTABLISSEMENTS CLASSÉS DE LA SEINE

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA NUTRITION AZOTÉE DE
L'*ASPERGILLUS REPENS* DE BARY.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS FAITES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1925 devant la Commission d'examen

MM. P. PORTIER . . . *Président.*

GUILLIERMOND . }
JAVILLIER . . . } *Examineurs.*

SAINT-DIZIER

ETABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

1925

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen M. MOLLIARD, *Professeur*. Physiologie végétale.

Doyen honoraire .. P. APPELL.

P. PUISEUX.

V. BOUSSINESQ.

Profess. honoraires. A. JOANNIS.

H. LE CHATELIER.

H. LEBESGUE.

A. FERNBACH.



Émile PICARD Analyse supér. et algèbre supérieure

G. KœNIGS Mécanique physique et expérimentale.

E. GOURSAT Calcul différentiel et calcul intégral.

P. JANET Electrotechnique générale.

F. WALLERANT Minéralogie.

H. ANDOYER Astronomie.

P. PAINLEVÉ Mécanique anal. et mécanique céleste.

E. HAUG Géologie.

Gabriel BERTRAND .. Chimie biologique.

Mme P. CURIE Physique générale et radioactivité.

M. CAULLERY Zoologie (Evolution des êtres organisés)

C. CHABRIÉ Chimie appliquée.

G. URBAIN Chimie minérale.

Émile BOREL Calcul des probabilités et Phys. math.

L. MARCHIS Aviation.

Jean PERRIN Chimie physique.

H. ABRAHAM Physique.

E. CARTAN Géométrie supérieure.

L. LAPICQUE Physiologie générale.

Professeurs E. VESSIOT Théorie des groupes et calc. des variat.

A. COTTON Physique générale.

J. DRACH Application de l'analyse à la géométr.

Charles FABRY Physique.

Charles PÉREZ Zoologie.

A. LEDUC Physique théorique et phys. céleste.

Léon BERTRAND Géologie appliquée et géol. régionale.

R. LESPIEAU Théories chimiques.

E. RABAUD Biologie expérimentale.

P. PORTIER Physiologie comparée.

É. BLAISE Chimie organique.

P.-A. DANGEARD ... Botanique.

C. MAURAIN Physique du globe.

P. MONTEL Mécanique rationnelle.

P. WINTREBERT ... Anatomie et histologie comparées.

O. DUBOSCQ Biologie maritime.

M. TIFFENEAU Chimie (Enseignement P. C. N.).

G. JULIA Mathématiques générales.

N. Géographie, physique.

N. Chimie générale.

E. HÉROUARD Zoologie.

Rémy PERRIER Zoologie (Enseignement P. C. N.).

G. SAGNAC Physique théorique et phys. céleste.

E. PÉCHARD Chimie (Enseignement P. C. N.).

V. AUGER Chimie analytique.

M. GUICHARD Chimie minérale.

A. GUILLET Physique.

C. MAUGUIN Minéralogie.

L. BLARINGHEM ... Botanique.

A. MICHEL-LÉVY . . Péetrographie.

Secrétaire Daniel TOMBECK ...

A M. LE PROFESSEUR M. RADAIS

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR
DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. GORIS

DIRECTEUR DE LA PHARMACIE CENTRALE DES HÔPITAUX
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MA FEMME

Je dédie ce travail.

ERRATA

Page 25. — Avant-dernière ligne, *au lieu de* : soit à celle de l'aliment azoté, *lire* : soit à celle de l'aliment carboné.

Page 56. — Tableau 12.

Ligne 2. Colonne 7, *au lieu de* : 14,18, *lire* : 12,8.

Ligne 3. Colonne 1, *lire* : 5,95 ; Colonne 3, *lire* : 17,5.

— Colonne 4, *lire* : 19,3 ; Colonne 7, *lire* : 22,89.

Ligne 4. Colonne 3, *lire* : 0,55 ; Colonne 4, *lire* : 0,51.

— Colonne 5, *lire* : 0,63 ; Colonne 6, *lire* : 0,67.

— Colonne 7, *lire* : 0,56.

Page 157. — 2^e ligne, *lire* : *Endothia parasitica*.

— 36^e ligne, *au lieu de* : Influence de la récolte, *lire* :
Influence de la réaction.

INTRODUCTION

C'est PASTEUR (1), au début de ses études sur les fermentations, qui attira le premier l'attention sur l'influence exercée par la réaction du milieu sur la culture des microorganismes.

A propos de la fermentation alcoolique et lactique « *il faut savoir, dit-il, que les circonstances de neutralité, d'alcalinité, d'acidité des liqueurs, ont une grande importance dans le développement prédominant de tels ou tels ferments, parce que leur vie ne s'accommode pas au même degré des divers états des milieux* ».

Nous vivons encore sur la distinction ainsi établie par PASTEUR, dès l'origine, entre champignons acidophiles et bactéries neutro ou basophiles.

Mais on ne pouvait soupçonner, il y a quinze ans, l'importance et l'aspect nouveau qu'allait prendre la notion de réaction des milieux. On ne peut accuser les auteurs anciens d'avoir méconnu cette importance, mais les méthodes mises à leur disposition par la chimie ne permettaient pas autre chose qu'une approximation. La notion de force d'un acide était d'une imprécision qui frôlait le mystère. Quant à celle de la neutralité, elle variait suivant l'indicateur choisi dans des limites variables et déconcertantes.

La théorie de la dissociation électrolytique d'ARRHÉNIUS permit d'abord de donner une définition exacte des acides et des bases, puis d'établir la relation qui existe entre leur force et la quantité d'ions H et OH mis en liberté dans le milieu. Mais les méthodes de mesure de la concentration des ions H restèrent longtemps du domaine des laboratoires de chimie physique et c'est à SÖRENSEN que revient l'honneur d'en avoir donné une expression mathématique commode, ainsi qu'une méthode de mesure simple (2).

(1) PASTEUR : *Œuvres de Pasteur*, t. 2, p. 10. Paris, 1922.

(2) Nous rappelons que la notation des *ph* est basée sur les conventions suivantes. Une série d'acides dissous dans l'eau, à la même concentration, se dissocient en cations $\overset{+}{\text{H}}$, porteurs des charges électriques, positives et en anions $\bar{\text{R}}$, porteurs des charges négatives. La dissociation et par suite la concentration des ions H obtenue dans chaque cas est

L'emploi des indicateurs pour la mesure du *ph* et la mise au point d'appareillages électriques plus simples ont vulgarisé cette notation et ces mesures dans les laboratoires de bactériologie.

Cependant les champignons inférieurs ont été peu étudiés à ce point de vue et si l'on excepte un travail d'ensemble de Boas (1918-1920) et quelques études de l'école américaine, les notions que nous possédons sur l'influence du *ph* sur la culture des moisissures sont restreintes.

d'autant plus élevée que l'acide est plus fort. La mesure de la concentration des ions H d'une solution donnera l'évaluation exacte de son acidité.

Chaque acide possède une constante de dissociation définie, d'après la loi d'action de masse, par l'expression :

$$Ka = \frac{(H) \times (R)}{(RH)}$$

Les mêmes observations s'appliquent aux bases, en remplaçant les ions H par les ions OH.

D'un autre côté, l'eau, liquide neutre par définition, est faiblement dissociée en ions H et ions OH, mais la concentration des ions H égale celle des ions OH. Tout acide apportera à l'eau un supplément d'ions H et toute base un supplément d'ions OH.

On a pu déterminer par de nombreuses méthodes, très différentes dans leur principe, mais remarquablement convergentes dans leurs résultats, la constante de dissociation de l'eau

$$K_w = \frac{(H) \times (OH)}{(H \cdot O)} = 10^{-14}$$

Mais dans le cas de l'eau, la dissociation étant extrêmement faible, la partie non dissociée se confond avec la masse du dissolvant. Le dénominateur égale donc ici l'unité et l'expression ci-dessus devient :

$$K_w = (H) \times (OH) = 10^{-14}$$

et comme la concentration des ions H égale celle des ions OH, la concentration des ions H de l'eau égale 10^{-7} .

La concentration des ions H dans les solutions acides s'étagera depuis 1 jusqu'à 10^{-7} et dans les solutions basiques depuis 10^{-7} jusqu'à 10^{-14} .

On pourrait utiliser ces expressions et, en fait, on les a utilisées jusqu'à Sørensen. L'usage a montré qu'elles étaient peu pratiques et, dans un but de commodité, Sørensen a proposé d'utiliser seulement l'exposant de la puissance de 10, et pour éviter l'emploi de nombres négatifs, de le changer de signe.

Cet exposant de H devient ainsi le PH. On devrait écrire le P^H , cette notation étant typographiquement peu commode, on lui a substitué, tout à fait conventionnellement, soit PH, soit *ph* ; il est aussi simple d'écrire *ph*, comme le fait Michaelis.

On trouvera de plus amples détails dans les ouvrages de Michaelis et de Clark, ainsi que dans diverses publications françaises. Un des exposés les plus clairs est celui de Douris (*Bull. d. Sc. pharm.*, 1923, t. 30, p. 469, 538).

Il m'a paru intéressant d'étudier, à l'aide de ces méthodes nouvelles, la nutrition azotée d'une moisissure très commune : l'*Aspergillus repens* de BARY.

Comme pour toutes les substances toxiques et même, pourrait-on dire, tous les aliments, il existe, pour la concentration des ions H et OH, une limite en deçà et au delà de laquelle la substance devient mortelle. Comme ces deux concentrations sont liées mathématiquement l'une à l'autre, la méthode des *ph* permet de ne tenir compte que de l'ion H : on parlera donc d'une limite supérieure et d'une limite inférieure du *ph* ; mais il est bien évident que dans un cas c'est l'ion H qui est l'agent toxique et dans l'autre l'ion OH.

Il y a donc une zone des *ph* qui permet la culture : en deçà et au delà de cette zone, le milieu devient toxique. Il faut d'ailleurs distinguer : les doses *infertilisantes*, qui empêchent seulement la germination des spores, les doses *inhibitrices*, qui arrêtent le développement du mycélium et les doses *toxiques*, qui tuent le mycélium. Ainsi nous verrons que les conidies d'*Aspergillus repens* ne germent qu'entre les limites $2,6 < ph < 8,4$. Mais le mycélium peut vivre jusque dans les solutions à $ph = 1,7$. Cette acidité ne suffit pas à tuer le mycélium qui est susceptible d'être revivifié. Mais on conçoit qu'une dose plus forte de H finirait par tuer la culture.

Dans la zone des *ph* où la culture est possible, il convient encore de distinguer une zone *optimum* où le développement est le plus rapide et des zones *dysgénésiques*, de part et d'autre de cet optimum, où la culture est possible mais lente et s'accompagne de phénomènes toxiques divers : formation de cellules géantes, disparition des appareils reproducteurs, etc.

Si l'on se contentait d'étudier ces limites, on ne verrait qu'un aspect du problème. Le champignon, par le fait même qu'il vit, qu'il respire, qu'il assimile et désassimile, modifie le milieu de culture et dans ce milieu, avant toutes choses, la réaction. Les variations de la réaction au cours de la culture, dans les périodes de développement, de dégénérescence permettent de suivre son métabolisme et leur étude est essentielle.

C'est encore PASTEUR qui le premier a attiré l'attention sur ce point. « La levure de bière, dit-il, agit fort mal au milieu d'une liqueur alcaline ; le plus souvent elle y est arrêtée. Elle est également gênée par une acidité même très minime contrairement à ce qui est admis généralement. C'est d'un milieu neutre qu'elle s'accommode le mieux, mais comme dans toute fermentation alcoolique ordinaire il se forme des acides, il y a une cause permanente de ralentissement de son action. » (*Œuvres de Pasteur*, tome 2, page 11, Paris 1922).

Ces changements dans la réaction du milieu sont liés à la nature des aliments offerts, à leur concentration, à la réaction initiale et aussi à d'autres propriétés que l'on commence à peine à connaître, telles que le **POUVOIR TAMPON** des milieux, le **POINT ISOÉLECTRIQUE** de certains aliments et des protéines des tissus. Ces changements peuvent avoir une très grande amplitude ; ils peuvent avoir pour effet de faire sortir le champignon de la zone eugénésique ou de l'y faire rentrer. Ils peuvent se produire en sens inverse, suivant que l'on part d'un milieu acide ou d'un milieu alcalin et avoir pour résultat d'amener, par convergence, la culture vers un *ph* moyen, identique dans les deux cas.

Mais ce serait une singulière illusion de voir dans ces phénomènes le fait d'un éclectisme automatique du végétal, capable d'amener, dans chaque cas, son milieu à la réaction la plus favorable. Cette convergence ne se produit que dans des cas déterminés. Dans d'autres cas, le champignon réalise des milieux nettement dysgénésiques, comme lorsqu'il se développe sur des sels ammoniacaux minéraux. Il se produit là une acidité qui ne correspond pas à celle que le champignon rencontre normalement dans la nature et qui peut même être rapidement mortelle, comme WEHMER l'a montré chez certains *Penicillium*.

Ces variations du *ph* peuvent être presque toujours expliquées par des réactions chimiques simples ; elles sont en majeure partie liées à la nutrition. Ainsi, l'assimilation d'un sel ammoniacal aboutit à la consommation de l'ion NH_4^+ et, par suite, à la libération de l'acide correspondant qui intervient dans le milieu avec ses caractères propres d'acide faible ou fort. L'assimilation d'un nitrate produira l'effet inverse.

Dans d'autres cas, l'attaque du sucre s'accompagne de la mise en liberté d'acides organiques : la formation d'acide oxalique ou d'acide citrique par le *Sterigmatocystis nigra* est bien connue.

La consommation de ces mêmes acides organiques libres ou salifiés, offerts comme source de carbone, s'accompagnera, comme dans le cas des nitrates, de la diminution de la concentration des ions H.

Enfin au cours des processus si remarquables d'autolyse que subissent les mycéliums de champignons dans les milieux épuisés, il se produit de façon constante de l'ammoniaque décelable par ses réactifs ordinaires et qui exerce son action propre sur le *ph*.

Voilà quelques-unes des réactions susceptibles de provoquer l'acidification ou l'alcalinisation des cultures. Nous ne les connaissons pas toutes, mais celles-ci sont les plus importantes et suffisent, dans bien des cas, à expliquer et à calculer la variation produite.

Une question qui a beaucoup préoccupé les bactériologistes est celle du *ph* limite, particulièrement du côté acide, atteint par la culture d'un microorganisme. Il est séduisant de voir dans cette valeur une sorte de constante caractéristique. Cette notion est exacte ; mais les résultats obtenus sont étroitement liés à la composition du milieu et aussi à l'âge de la culture. Il est rare, une fois réalisée la concentration maxima des ions H, de voir celle-ci se maintenir à ce niveau.

Le métabolisme de l'aliment azoté et carboné joue dans ces phénomènes un rôle essentiellement prépondérant. Leur étude systématique ne pourra être réalisée qu'en dissociant leur action. Ainsi l'alcalinisation prévue, inévitable, qui est la conséquence de l'assimilation des nitrates, pourra être masquée par la production d'acides organiques aux dépens du sucre. Le *Sterigmatocystis nigra* qui produit de grandes quantités d'acide oxalique sera un mauvais matériel d'étude.

C'est ce qui m'a amené à écarter le *Sterigmatocystis nigra*, objet classique des recherches physiologiques, pour m'adresser à l'*Aspergillus repens* de BARY. Ce champignon présente deux sortes de fructifications : une reproduction asexuée par conidies, une reproduction sexuée par asques et ascospores nées à l'intérieur d'un péricarpe. Il était intéressant de rechercher comment la réaction du milieu agissait sur l'apparition de ces deux formes. Disons tout de suite que les résultats obtenus manquent de netteté. Et cela se conçoit, ces appareils demandant plusieurs jours pour se former ; or, au cours d'une telle période de culture, le *ph* a subi des variations qui nous éloignent du *ph* initial et compliquent les données du problème.

Au cours de cette étude nous avons envisagé la nutrition de l'*Aspergillus* à l'aide des principales fonctions azotées :

Azote nitrique,

Azote ammoniacal des sels d'acides minéraux et organiques,

Azote aminé des amino-acides,

Amides,

Matières protéiques complexes,

et, dans chaque groupe, avec quelques représentants typiques. Notre but n'était pas en effet de rechercher quelles molécules azotées sont susceptibles d'être assimilées par l'*Aspergillus*, travail qui a été déjà abordé par de nombreux auteurs, comme CZAPEK, KOSSOWICZ, BRENNER et où l'essentiel a déjà été fait.

Ce travail a été entrepris au laboratoire de Botanique crypto-

gamique de la Faculté de Pharmacie de Paris. C'est pour moi un agréable devoir de remercier M. le Professeur Radais, doyen de la Faculté, des conseils et des encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer depuis que je suis entré dans son laboratoire et qui m'ont permis d'entreprendre et de mener à bien ces recherches.

M. le Professeur agrégé Goris a été mon maître dans les hôpitaux et mon initiateur à la vie scientifique. Je suis heureux de lui exprimer ici le témoignage de ma profonde gratitude.

HISTORIQUE

Dans un milieu de culture complet, renfermant la constante minérale, l'aliment azoté et l'aliment carboné sous des formes et des proportions convenables, le développement d'un microorganisme est conditionné avant tout par la réaction du milieu.

D'une façon générale, les bactéries préfèrent les milieux neutres ou très légèrement alcalins, les champignons les milieux légèrement acides ; les milieux, même très légèrement alcalins, arrêtent vite leur développement. Par contre, ils peuvent supporter des concentrations acides qui, pour des espèces comme le *Sterigmatocystis nigra* et l'*Aspergillus repens*, peuvent être très considérables. En exprimant cette acidité en fonction de la concentration des ions H et avec la notation des *ph*, on trouve que les conidies d'*Aspergillus repens* peuvent germer depuis *ph* 8,4 jusqu'à *ph* 2,6. C'est une zone remarquablement étendue mais que l'on retrouve chez la plupart des moisissures. Les bactéries, surtout les bactéries pathogènes, ont des exigences plus strictes (DERNBY, 48).

Mais si les conidies voient leur développement inhibé au delà de *ph* 2,6, le mycélium peut vivre et se développer jusqu'à *ph* 1,8-1,7, ce qui correspond à une solution N/50 de HCl. D'autre part, les conidies qui n'ont pas germé dans les solutions à *ph* inférieur à 2,6 ne sont pas tuées et, replacées dans un milieu favorable, peuvent se développer ; cependant une concentration suffisamment élevée de H les tuera définitivement. On conçoit que les diverses manifestations vitales des microorganismes puissent être inhibées à des *ph* différents.

L'influence de la réaction apparaît ainsi comme très complexe et son étude systématique devrait embrasser toutes les manifestations vitales du végétal. Les limites de germination et de culture semblent en tous les cas caractéristiques d'un organisme déterminé et sont indépendantes du milieu, pour autant que celui-ci ne renferme pas d'autres substances toxiques.

C'est la germination des spores qui se prête d'ailleurs aux observations les plus précises : on peut l'obtenir dans des solutions salines

non nutritives et même dans l'eau pure ; dans tous les cas, elle ne modifie que peu ou pas la réaction initiale. Dans les autres observations, le champignon vit sur le milieu en expérience et, par le jeu de sa nutrition, de sa respiration, modifie à chaque instant la réaction dans des limites qui peuvent être considérables.

C'est là un deuxième aspect du problème et qui n'est pas le moins intéressant. Ces variations dans la réaction peuvent avoir une amplitude et une intensité remarquables. Elles peuvent consister dans une acidification, une alcalinisation, aboutir à une concentration des ions H caractéristique d'une espèce déterminée. Ainsi l'*Aspergillus niger*, sur milieux sucrés, amène le *ph* à la valeur 1,7 (CLARK et LUBS, 37). Le *Bacillus coli*, sur milieux sucrés, atteint le *ph* 4,56 (CLARK, 35), alors que les bactéries du groupe typhique ne dépassent pas *ph* 6. Le maximum une fois réalisé peut rester constant : c'est notamment le cas où le végétal est sorti de sa zone de végétation. L'acidité produite peut être assez considérable pour suspendre la vie du végétal et même, à la longue, pour le tuer. Le cas est fréquent chez les bactéries où l'acidification des milieux est la cause la plus fréquente de la mort des cultures. Des cas analogues ont été observés par WEHMER (175) sur *Penicillium variable*. Lorsque au contraire le champignon n'est pas sorti de sa zone de végétation, cette acidité limite ne persiste pas et il y a, le plus souvent, régression du *ph*.

Nous avons envisagé le cas le plus fréquent, l'acidification ; mais dans certaines conditions, il y a alcalinisation, soit dès le début, soit tardivement. Enfin il peut y avoir des variations en sens inverse amenant le *ph* à une valeur intermédiaire. Il en résulte comme une convergence du *ph* qui a vivement frappé les premiers observateurs.

Ces variations sont sous la dépendance étroite de l'aliment offert et du *ph* initial. Leur amplitude est surtout réglée par le pouvoir tampon du milieu. Nous connaissons le plus souvent la nature de la réaction génératrice et nous pouvons en écrire le bilan. Ainsi l'assimilation de l'ammoniaque du chlorhydrate d'ammoniaque aboutit à la libération de HCl et l'acidification observée est proportionnelle à la quantité d'ammoniaque fixée.

La nutrition azotée nous apparaît ainsi comme un des facteurs prépondérants de ces changements et, par la variété des combinaisons azotées assimilables, nous offre un champ d'études considérable. Ce n'est pas le seul et la fermentation des sucres peut aboutir à la production d'acides organiques, plus ou moins dissociés et

capables d'agir sur le *ph*. Puis ces acides peuvent être attaqués à leur tour dans une phase ultérieure, ce qui amène une variation en sens inverse.

En résumé, on peut envisager la question sous un double aspect :

1^o Influence de la réaction du milieu sur le végétal et dans ce cas la nature de l'aliment ne joue qu'un rôle effacé ;

2^o Action du végétal sur la réaction et ici la nature de l'aliment est essentielle.

PREMIÈRE PARTIE

INFLUENCE DE LA RÉACTION DU MILIEU SUR LE VÉGÉTAL

C'est principalement la germination des conidies qui a été étudiée à ce point de vue : mais on doit distinguer les travaux effectués avant 1915, où les expérimentateurs ont exprimé leurs résultats en fonction de la concentration moléculaire des acides utilisés et ceux qui ont été entrepris avec la notation nouvelle de l'acidité. Parfois, dans les anciens travaux, on a donné, en fonction de la constante de dissociation des acides utilisés, la concentration théorique des milieux en ions H, mais comme il s'agit de solutions nutritives complexes, le nombre hydrogène de ces solutions est en réalité inconnu, par suite du pouvoir tampon des autres constituants.

LINOSSIER et ROUX (97) sont des premiers à signaler l'influence de la réaction sur un champignon, le parasite du muguet, qui donne des cultures plus abondantes sur milieux alcalins, ce qui constitue par conséquent une exception parmi les champignons.

KAHLENBERG et TRUE, dès 1896 (79), expriment l'idée que l'action physiologique des solutions d'électrolytes est due surtout aux ions présents dans la solution et, pour une faible part, aux molécules non dissociées. Leurs expériences, qui ont porté sur de jeunes radicules de lupin plongées dans des solutions d'acides divers, ont établi que les acides minéraux, HCl en tête, étaient très toxiques et que leur toxicité était liée à la quantité d'ions H présents dans la liqueur. Quant à l'acide acétique et à ses homologues, leur toxicité très élevée, eu égard à leur faible dissociation, est principalement due aux molécules non dissociées. Ces résultats, vieux de trente ans, ont été confirmés par tous les auteurs suivants.

STEVENS (159), en 1898, a étudié la germination de cinq espèces : *Botrytis cinerea* Fr., *Macrosporium* sp., *Penicillium crustaceum* Linn., *Gloeosporium musarum* C. et M., *Uromyces caryophyllinus* (Schrank) Schr., dans l'eau additionnée de sels, d'acides et de bases divers. Les germinations sont irrégulières dans l'eau pure ; la présence de toxiques amène des résultats très variables suivant les espèces. D'une façon générale, les spores de moisissures sont très résistantes.

Peu après, CLARK (34) a étudié le développement des spores de

cinq espèces différentes : *Aspergillus niger* V. Tiegh., *Aspergillus flavus* Link., *Oedocephalum albicum*, *Penicillium glaucum* Link., *Botrytis cinerea* Fr., qui ont été mises à germer en goutte pendante dans des cellules VAN TIEGHEM. Le milieu utilisé est une infusion de betteraves additionnée de quantités croissantes d'acides minéraux ou organiques. Les résultats obtenus par CLARK sont valables dans leurs grandes lignes et confirment ceux de KAHLENBERG et TRUE, mais ils sont entourés d'une certaine incertitude due à la méthode utilisée. Le cas des acides mono-, di- et trichloracétiques est particulièrement intéressant. L'introduction d'un atome de chlore dans la molécule augmente la toxicité moléculaire. Mais d'un autre côté, la dissociation s'élève de l'acide acétique à l'acide trichloracétique qui est un véritable acide fort. Cette forte dissociation accroît la proportion des molécules ionisées et diminue celle des molécules existant à l'état moléculaire, si bien que, dans les conditions ordinaires, l'acide trichloracétique n'est pas plus toxique que l'acide acétique.

DUGGAR (52) utilise l'eau comme médium et observe alors que l'addition d'acides organiques a une action stimulante sur la germination des spores d'*Aspergillus flavus* et de *Sterigmatocystis nigra*, mais il y a de nombreuses différences entre les espèces et la solution N/100 d'acide oxalique qui favorise la germination de *Sterigmatocystis nigra*, arrête celle d'*Aspergillus flavus*.

BROOKS (29) s'est préoccupé de l'action combinée de la température et des acides. Il opère sur du bouillon de bœuf à 600/1000, qu'il dilue au moment de l'emploi. L'action des acides toxiques croît très vite avec la température. Au contraire, l'injure infligée par les toxiques est presque nulle sur des spores inhibées par le froid.

RITTER (145), dans ses recherches sur les cellules géantes et les formes levures rencontrées chez les Mucorinées, a fait une observation qui montre les erreurs considérables commises par tous les auteurs précédents. L'apparition des cellules géantes s'observe chez *Mucor racemosus* Fres., avec des concentrations très différentes de HCl, suivant que l'on utilise comme source d'azote le nitrate d'ammoniaque ou la peptone. Dans le premier cas, une concentration 0,006N suffit à déclencher le phénomène ; dans le deuxième cas, cette concentration s'élève à 0,002, soit 3 fois plus. Les malate, citrate, tartrate d'ammoniaque agissent comme la peptone. RITTER attribue ces différences à une action propre de l'azote minéral ou organique. Son observation est exacte et facile à répéter, mais son explication certainement erronée : la peptone et les sels organiques

agissent simplement par leur pouvoir tampon et abaissent le *ph* de la solution acide utilisée : le phosphate d'ammoniaque se serait comporté comme eux.

PELTIER (129), avec *Botrytis cinerea* Fr., obtient des cultures intenses sur milieux acides, faibles sur milieux alcalins. Une forte acidité rend le mycélium stérile, une forte alcalinité diminue les sclérotés et augmente les conidies.

COOLEY (43) signale que le développement de *Sclerotinia cinerea* (Bon) Schr., se produit facilement sur milieux acides, comme la décoction de pruneaux ou le suc de cerises acides. Sur milieux neutres, il n'y a pas d'abord de développement, puis, au bout de deux semaines, le mycélium se développe et la réaction devient acide. La production de spores est abondante sur milieux acides, nulle sur milieux alcalins.

A partir de 1915, les méthodes de SÖRENSEN se sont imposées et nous devons, à l'école américaine principalement, une série de travaux importants sur l'action des ions H à l'égard des champignons.

En 1916, ZELLER (182), opérant sur 4 champignons lignicoles, trouve qu'ils ne poussent bien que sur milieux acides ou faiblement alcalins. Ces espèces présentent une intolérance marquée pour les milieux alcalins.

L'année suivante, DUGGAR, SEVERY et SCHMITZ (53) étudient le développement de *Macrosporium commune* Rabh., *Aspergillus niger* V. Tiegh., *Penicillium expansum* Link., *Glomerella Gossypii*, sur des infusions végétales dont ils expriment l'acidité dans l'échelle de FULLER, mais ils n'ont pas établi les limites inférieure et supérieure de développement.

CURRIE (44), dans son étude sur la fermentation citrique par l'*Aspergillus niger*, a vu le développement se produire encore pour *ph* 1,4, correspondant à une solution à 20 % d'acide citrique. La réaction initiale la plus favorable à la production d'acide citrique est voisine de *ph* 3,4, réalisée par addition d'acide minéral au milieu de culture.

MEACHAM (110) étudie 4 champignons lignicoles : *Lenzites sapia-ria* (Wulf.) Fres., *Fomes roseus* (A. et S.) Karst., *Coniophora cerebella* Pers., *Merulius lacrymans* (Wulf.) Fres. Leurs spores germent rapidement jusqu'à *ph* 2,6, avec optimum vers *ph* 3. Puis la proportion des spores germées diminue rapidement jusqu'à *ph* 1,9 et l'arrêt total se produit à *ph* 1,7.

GAYNEY (65), dans ses études sur les *Actinomyces*, trouve que

leur présence dans le sol est liée à un *ph* voisin de 6. WAKSMAN et JOFFE (170) confirment ce résultat.

BRIGHTMAN, MEACHAM et ACREE (28), avec *Endothia parasitica* (Murr.) Anders., sur des milieux stabilisés par un mélange de phosphates et d'acide citrique, ont trouvé que la germination commence à *ph* 2,6, est très peu active jusqu'à *ph* 4, où se manifeste un brusque maximum pour *ph* 4,5, puis la courbe représentative forme un plateau jusqu'à *ph* 8 et s'annule à *ph* 8,5. L'étude attentive de la courbe permet de supposer l'existence d'un deuxième maximum vers *ph* 7.

GILLESPIE (66) a étudié diverses espèces d'*Actinomyces scabies* (*A. chromogenus*) et trouve comme limites *ph* 4,8 à *ph* 7,2. Cependant un *ph* 5,2 inhibe le plus souvent le champignon. C'est donc une espèce très sensible aux acides, comme l'avaient déjà vu LUTMAN et CUNNINGHAM (103).

SCHMITZ (153) opère sur des champignons lignicoles : *Fomes pinicola* (Fres.) Sacc., *Lenzites sæpiaria* (Wulf.) Fres., *Polystictus versicolor* (L.) Fres., cultivés sur infusion de carotte gélosée. Il exprime, comme l'avaient déjà fait DUGGAR, SEVERY et SCHMITZ, les résultats avec l'échelle de Fuller. Les deux premières espèces sont beaucoup moins sensibles à l'acidité que la troisième.

STEINBERG (158) constate que l'addition de 7 acides différents au milieu de culture (milieu de PFEFFER) produit dans tous les cas le même résultat, accélération du développement, diminution des spores, contrastant avec l'alcalinisation qui ne produit pas les mêmes effets.

ZELLER, SCHMITZ et DUGGAR (183) continuant les études de DUGGAR, SEVERY et SCHMITZ sur les champignons destructeurs des bois, ont cultivé 12 espèces sur des milieux artificiels très divers : milieux de CZAPEK, de DUNHAM, de REED, de RICHARD, suc d'*Acer saccharinum*, décoction de pin, dont les *ph* s'étendent de *ph* 4,8 à *ph* 8,6. Ils considèrent que, dans ces limites, la concentration des ions *h* n'est pas un facteur susceptible d'arrêter la germination des spores.

ARMSTRONG (3), sur milieu de RICHARD, où le soufre est fourni sous forme de $S^2O^3Na^2$, ou de SO^4Mg , a observé l'inhibition des spores d'*Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium*, *Botrytis cinerea* au delà de *ph* 3. L'optimum se place entre 4 et 6 suivant les espèces.

KARRER (80) a étudié les limites de 3 espèces sur milieu de CZAPEK additionné d'amidon soluble : *Fusarium* sp., pousse de *ph* 2 à *ph* 9,2 ; *Colletotrichum Gossypii* Southw., de *ph* 3 à *ph* 9,2 ; *Penicillium italicum* Welmer, de *ph* 2,5 à *ph* 8 seulement. Les cultures de *Fusarium* et celles de *Colletotrichum* se sont alcalinisées.

EZEKIEL (63) a donné les limites du *ph* pour le champignon du brownroot des arbres à noyau (*Sclerotinia apothecia*). L'optimum se trouve vers *ph* 2,5 ; du côté alcalin, le développement cesse à *ph* 7,7.

LINDFORS (96), pour les diverses espèces de *Fusarium* qu'il a étudiées, trouve un optimum du côté acide, variable suivant les espèces, puis, du côté de *ph* 7, il y a une baisse rapide de la courbe de croissance.

Enfin, WEBB en 1919 et 1920 (172) étudie l'influence du *ph* sur toute une série de champignons : *Aspergillus niger* V. Tiegh., *Penicillium italicum* Wehmer, *Penicillium cyclopium*, *Puccinia graminis* Pers., *Lenzites sepiaria* (Wulf.) Fres., *Fusarium* sp., *Colletotrichum Gossypii* Southw., sur des milieux très divers : solution de mannite, de peptone, milieu de CZAPEK, solutions pures de HCl, de NaOH, infusion de betteraves. D'après le pourcentage des spores germées, il trouve des limites variables suivant les espèces et, pour une même espèce, suivant la température, le milieu, etc. La plupart des espèces germent de *ph* 2,5 à *ph* 8, avec un optimum à *ph* 3 et parfois un deuxième optimum vers *ph* 7 (*Fusarium* sp., *Penicillium cyclopium*). C'est l'infusion de betteraves qui présente les limites les plus étendues, du côté alcalin surtout, où beaucoup d'espèces germent encore à *ph* 10. WEBB attribue le fait au faible pouvoir tampon de cette infusion.

WOLPERT (179) a repris les études de ses devanciers sur les champignons destructeurs des bois et a donné les limites entre lesquelles leurs spores germent, soit sur milieu de RICHARD, soit sur solution de peptone. *Polystictus versicolor*, qui germe de *ph* 2,5 à *ph* 7,6, présente la zone la plus étendue. *Dædalea confragosa* (Bolt.) Fres., germant de *ph* 3,5 à *ph* 7,2, a la zone la plus restreinte. Sur peptone, ces limites sont plus étendues et peuvent aller jusqu'à *ph* 8,5 du côté alcalin.

BOYLE (25), au cours de ses études sur l'influence des produits du métabolisme de *Fusarium* sp., sur la germination des spores de *Botrytis cinerea* Fr., a établi les limites de germination de ces deux espèces sur divers milieux. C'est ainsi que *Fusarium* sp., germe de *ph* 3,4 à *ph* 10 sur milieu de RICHARD et de *ph* 2,2 à *ph* 8 sur décoction de pommes. Les conidies de *Botrytis cinerea*, sur milieu de RICHARD, germent de *ph* 1,7 à *ph* 9,5 et de *ph* 2,2 à *ph* 9,5, sur décoction de pommes. Il y a un seul maximum du côté alcalin, entre *ph* 7 et *ph* 8. PRATT (131) confirme ces résultats.

DEUXIÈME PARTIE

INFLUENCE DU CHAMPIGNON SUR LA RÉACTION DU MILIEU

Nous avons établi plus haut que la réaction du milieu de culture était à chaque instant modifiée par la vie même du champignon. Le sens de cette variation, pour un organisme déterminé, est lié à la composition chimique du milieu, à la réaction initiale, à l'âge de la culture et, sans doute aussi, à la température et à d'autres circonstances, comme l'aérobiose ou l'anaérobiose. Son amplitude est liée avant tout à certaines qualités du milieu, dont le pouvoir tampon est la plus importante. Il convient donc, pour se faire une idée exacte du phénomène, de l'étudier pour chaque aliment déterminé. L'aliment azoté y joue un rôle prépondérant et, par la diversité des combinaisons azotées assimilables, rend cette étude particulièrement instructive.

Au début, on s'est surtout préoccupé de la nature des combinaisons azotées assimilables. RAULIN (137), NAEGELI (123), LUTZ (104), CZAPEK (45), RACIBORSKI (135), KOSSOWICZ (86) et (88) à qui nous devons des études d'ensemble sur la nutrition azotée, ne se sont que peu ou pas préoccupés des changements intervenus dans le liquide de culture. Si l'on met de côté une observation de LAURENT (93), qui a signalé les différences morphologiques des cultures de *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link., sur $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$ et sur NO^3Na , c'est TANRET (161) et WEHMER (173) qui ont les premiers caractérisé la mise en liberté d'un acide minéral fort (NO^3H) au cours de l'assimilation du sel ammoniacal correspondant.

BUTKEWITSCH (30) confirme ces résultats en 1902, en ce qui concerne les sels ammoniacaux minéraux. Dans le cas de la peptone, l'*Aspergillus niger* provoque la formation, par désamidation, d'une énorme quantité d'ammoniaque. Cette base n'alcalinise pas le milieu car elle est neutralisée par la formation d'une quantité équivalente d'acide oxalique. Le *Penicillium glaucum* et les *Mucor*, qui ne produisent pas d'acide oxalique, ne produisent pas non plus d'ammoniaque. L'acide oxalique joue donc le rôle de régulateur de la réac-

tion au cours de la nutrition azotée. La production d'ammoniaque à partir de la peptone est l'œuvre d'une exodiasfase.

NIKITINSKY (125), dans des recherches entreprises sur l'influence des produits du métabolisme de l'*Aspergillus niger* sur la culture ultérieure du champignon, montre qu'en présence d'un excès de sucre l'effet toxique des vieilles cultures est dû uniquement à l'accumulation de l'acide du sel ammoniacal utilisé. Il cite des taux de 0,584 % de HCl, et de 1,26 % de NO^3H . En neutralisant cet acide, on peut obtenir des cultures successives très importantes. NIKITINEKY insiste fortement sur le fait que l'acidification des cultures n'est pas due ici à l'acide oxalique, comme on le croyait depuis WEHMER (l. c.) et KUNTSMAN (91).

Enfin dans un mélange NH_4Cl + tartrate d'ammoniaque, l'acide tartrique diminue la dissociation de HCl produit et le milieu ne devient pas dysgénésique. On peut ainsi, sans neutralisation, faire une série de cultures sur le même milieu.

RITTER (143), reprenant le travail de LAURENT sur les champignons nitrophiles, montre que les conclusions de l'auteur belge reposaient sur une base expérimentale insuffisante. Les champignons *Aspergillus glaucus* de Bary, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Mucor racemosus* Fres., qui d'après LAURENT préfèrent les nitrates, sont ceux qui ne peuvent supporter de fortes doses d'acides libres, comme il s'en produit au cours de l'assimilation du sulfate d'ammoniaque. En remplaçant le sulfate par le phosphate, il y a mise en liberté d'acide phosphorique, acide faible, peu dissocié et qui permet, avec l'*Aspergillus glaucus* notamment, une culture plus abondante que NO^3Na .

HAGEM (70), en ce qui concerne les Mucorinées, montre que ces champignons ne peuvent supporter une acidité élevée et que les sels ammoniacaux minéraux ne leur conviennent que si on neutralise l'acide libéré par CO^3Ca . Malgré de fortes différences entre les espèces, il est bien établi que les Mucorinées se différencient des Hyphomycètes par cette particularité.

KIESEL (81) apporte à son tour une donnée intéressante. Avec les sels ammoniacaux d'acides inassimilables, l'acidité que peut réaliser l'*Aspergillus niger*, une fois obtenue, se maintient constante. Le champignon n'a pas le moyen de se défendre contre l'accumulation des acides. Par contre, avec les sels ammoniacaux d'acides à radical assimilable, l'acidité limite atteinte diminue ensuite par suite de la consommation par le végétal de l'acide libéré au cours de la première phase.

WEHMER (174) a observé l'apparition de cellules géantes dans de vieilles cultures d'*Aspergillus fumigatus* Fres., sur $\text{NO}^3(\text{NH}^4)$, en relation avec l'acidification de ces cultures, confirmant ainsi les vues de RITTER. Cette action des acides issus du métabolisme peut aller jusqu'à la mort du champignon. (*Penicillium variable*) (WEHMER) (175). Avec l'*Aspergillus niger*, il n'y a pas mort du mycélium et l'acidité produite baisse ensuite lentement, par suite de phénomènes divers où la protéolyse joue le principal rôle.

BRENNER (27), à qui nous devons une revue complète de nos connaissances sur l'assimilation de l'azote par les champignons inférieurs, a cultivé l'*Aspergillus niger* sur plus de 70 composés. Il a donné pour chacun les courbes de croissance en fonction des récoltes obtenues aux différents jours de la culture. Il a dosé également l'acidité potentielle de ses cultures. Ses résultats confirment dans leurs grandes lignes ceux que nous venons d'exposer. Avec les sels ammoniacaux d'acides forts, l'acidité produite au 4^e ou 5^e jour de la culture est telle qu'une deuxième culture est impossible, mais au douzième jour, l'acidité a baissé suffisamment pour permettre une deuxième culture. Avec les nitrates, le milieu reste faiblement acide, fait dû à la production d'acide oxalique. C'est à la même raison qu'est due l'acidification observée avec d'autres sources d'azote qui normalement devraient conduire à une alcalinisation.

RITTER (146) a repris en 1914 l'étude de l'assimilation de l'ion nitrique par l'*Aspergillus niger*. Celui-ci peut utiliser l'acide pur à la concentration 0,03 M (sur milieu de CZAPEK) et même, sous cette forme, on obtient de meilleurs résultats qu'avec les nitrates qui provoquent une mauvaise utilisation du sucre, par suite de sa transformation partielle en acide oxalique. Quand on utilise NO^3NH^4 , les résultats varient suivant la dose. Avec 1,68 %, l'ion nitrique est pour ainsi dire complètement protégé; le champignon n'absorbe que l'ion ammoniacal, ce qui amène une intense acidification et l'arrêt de la culture. Avec une dose réduite, l'ion nitrique finit par être absorbé en presque aussi grande quantité que l'ion ammoniacal. La culture est abondante et renferme une grande quantité d'acide oxalique.

EHRlich et ses collaborateurs ont effectué de 1911 à 1917 (55 à 59) une série de belles recherches sur les premiers produits de l'attaque des aminoacides par les champignons. Ces travaux, qui ont abouti à la mise en évidence des processus de désamination comme préambule de toute assimilation, seront résumés plus loin.

L'ammoniaque apparaît ainsi comme la véritable source d'azote

pour les moisissures et dans un mélange *sel ammoniacal* + *amino-acide*, le champignon consomme d'abord le sel ammoniacal, comme l'ont montré ZALEWSKI et ISRAILSKY (180) et ZALEWSKI et PJUKOW (181). Ces auteurs en ont fait la démonstration en dosant, après la culture, l'azote ammoniacal et l'azote aminé restants. Ils auraient aussi bien pu l'établir par l'acidification des milieux, comme devait le faire plus tard BOAS.

BUTKEWITSCH, 1922 (31 à 33), au cours de ses travaux sur la genèse de l'acide oxalique dans les cultures fungiques, a été amené à étudier sous quelle forme ce corps existe dans les cultures. On admettait depuis WEHMER que ce corps, servant au végétal à lutter contre l'alcalinisation produite par l'ammoniaque, devait exister sous forme d'oxalate neutre. Dans les cultures sur peptone sans sucre, en dosant simultanément *acide oxalique* et *ammoniaque*, BUTKEWITSCH a trouvé qu'il y avait toujours excès d'ammoniaque, excès servant visiblement à neutraliser d'autres acides apparus au cours des processus de désamination des constituants de la peptone. Dans les vieilles cultures, il y a même de l'ammoniaque libre susceptible de passer directement à la distillation sans alcalinisation.

TRAVAUX POSTÉRIEURS A 1915.

A partir de 1915, les nouvelles méthodes de SÖRENSEN et de CLARK vont permettre une analyse plus précise des variations de la réaction au cours de la nutrition azotée.

CLARK et LUBS (37), dans leur travail initial, signalent que sur milieu sucré et nitraté, l'*Aspergillus niger* élève son acidité jusqu'à pH 1,7. WATERMAN en 1913 (171) avait indiqué comme acidité limite atteinte par les champignons, une concentration de H égale à :

$$\begin{array}{l} 1 \times 10^{-5} \text{ pour } \textit{Penicillium glaucum} \\ 1,5 \times 10^{-5} \text{ — } \textit{Aspergillus niger}. \end{array}$$

Les auteurs américains attribuent cette énorme différence à une erreur qu'aurait commise WATERMAN dans l'expression de la concentration de H.

Mais c'est à BOAS que nous devons les études les plus importantes sur la variation de l'acidité réelle, au cours de la culture des champignons inférieurs. Ses études ont porté sur des espèces appartenant à divers groupes : *Levures*, *Mycoderma*, *Oidium*, *Aspergillus*, et sur les principaux types d'aliments azotés et carbonés. Le point de départ de ses travaux réside dans l'observation qu'il fit de l'appari-

tion d'amidon soluble dans les cultures d'*Aspergillus niger* (BOAS, 13 à 16). Cet amidon soluble ne se forme que dans les cultures où l'acidité atteint un niveau suffisant. Il faut un *ph* différent suivant les sucres : 2,25 pour le saccharose, 1,85 pour le dextrose, 1,57 pour le maltose. Ces valeurs sont atteintes facilement dans les cultures sur sels ammoniacaux minéraux, mais, avec d'autres sources d'azote : amino-acides, peptone, où l'acidification est due à la formation d'acide oxalique, ces conditions ne sont pas toujours réalisées.

Avec l'*Aspergillus fumigatus* (BOAS et LEBERLE, 21) on obtient les résultats suivants :

avec NH_4Cl	<i>ph</i> 1,56	au 4 ^e jour.
l'alanine	3,50	3 ^e »
urée	5,29	4 ^e »
urée + $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$		
traces	5,09	6 ^e »

Ces maximums une fois atteints, la culture revient vers la zone alcaline, mais cette alcalinisation n'est pas due à la protéolyse, car elle ne s'accompagne pas d'une diminution de récolte, du moins au début.

Avec l'*Aspergillus niger* (BOAS et LEBERLE, 22), on obtient dès le 3^e jour *ph* 1,68 avec $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et *ph* 2,33 avec l'alanine, mais, dans ce dernier cas, il y a une diminution rapide de la concentration de *h* et l'on atteint *ph* 7,12 au 16^e jour.

Avec les levures (BOAS et LEBERLE, 21) les phénomènes d'acidification sont moins marqués : même avec NH_4Cl , on n'obtient que *ph* 2,94 au 9^e jour.

Avec l'*Oidium lactis* (22), l'influence des divers sucres, déterminée en présence d'asparagine, est très caractéristique. On les a groupés dans le tableau ci-dessous :

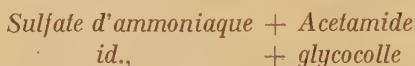
Sucre	<i>ph</i> initial	<i>ph</i> au 6 ^e jour
Glucose	4,97	3,16
Glycérine	4,75	3,14
Saccharose,	4,73	7,68
Maltose	4,35	7,98

Ils indiquent que l'utilisation de l'asparagine se fait différemment suivant le sucre offert.

L'acidification des cultures est donc liée, soit à la dégradation de l'aliment azoté, soit à celle de l'aliment azoté, soit à l'action combinée de ces deux causes,

D'après BOAS (15), ce sont les sels ammoniacaux qui constituent les meilleures sources d'azote pour les moisissures. L'opinion contraire de CZAPEK et de PURIEWITSCH (133), qui font des amino-acides les meilleurs aliments azotés, ne repose que sur des expériences entachées d'erreurs ou mal interprétées. CZAPEK, par exemple, n'a pas tenu compte de la protéolyse intense survenue dans ses cultures prolongées trop longtemps avec une dose insuffisante de sucre (3 %), ni de l'action toxique exercée par les acides minéraux au cours de l'assimilation de corps comme NH_4Cl ou $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$. C'est au fond l'argument qui avait déjà servi à RITTER à ruiner l'opinion de LAURENT sur la prééminence de l'azote nitrique pour l'*Aspergillus glaucus*.

BOAS et LEBERLE (23), reprenant d'anciennes expériences de ZALEWSKY et ISRAILSKY et de ZALEWSKI et PJUKOW signalées plus haut, ont montré que dans les mélanges suivants :



l'*Aspergillus niger* absorbe uniquement le sel ammoniacal, malgré l'acidification intense qui en résulte. Ils démontrent en même temps que la réaction réalisée par un microorganisme dépend essentiellement de l'aliment offert et qu'elle n'est pas le résultat d'une sorte de choix délibéré de l'organisme, dans le but de réaliser une réaction optimum.

À côté des travaux de BOAS se placent les recherches de l'école américaine. ZELLER, SCHMITZ et DUGGAR (183), dans leurs études déjà signalées sur les champignons destructeurs des bois, ont toujours rencontré une acidification au cours de la germination des spores, sauf avec *Merulius pinastri* (Fr.) Burt. Ainsi *Polystictus versicolor*, sur milieu de CZAPECK, à *ph* initial 8,6, pousse lentement et amène la réaction à *ph* 4,8 au 30^e jour.

WAKSMAN et JOFFE (170), dans leurs études sur le groupe des *Actinomyces*, ont vu que ces champignons manifestaient une grande sensibilité à l'égard de toutes les causes d'acidification. Les sels ammoniacaux, de ce chef, ne leur conviennent pas. Les milieux à base de peptone, d'amino-acides, d'urée s'alcalinisent généralement. Cependant, la présence de sucre favorise le plus souvent une acidification initiale. Les nitrates sont de bons aliments.

NÆSSLUNG et DERNBY (124), cultivant divers *Actinomyces* sur bouillon peptone, trouvent des limites analogues à celles déjà signalées par WAKSMAN. Les *Actinomyces* peuvent se développer entre *ph* 5 et *ph* 9. Sur milieu privé de sucre, il y a alcalinisation ; sur mi-

lieux sucrés, on observe d'abord une légère acidification : le *ph* passe de 6 à 5 ; puis, le sucre consommé, le milieu s'alcalinise jusqu'à *ph* 8.

Enfin, au cours de l'année 1924, nous trouvons une série de travaux qui ont été poursuivis en même temps que les nôtres.

MOORE (122), après avoir établi les limites entre lesquelles *Fusarium cæruleum* Sacc., peut se développer (*ph* 3 à *ph* 10), a cultivé ce parasite sur milieux à base de $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$, d'asparagine et de nitrate de potasse. Avec le sel ammoniacal, l'acidité atteint au 9^e jour *ph* 2,9 ; avec l'asparagine et le nitrate, la réaction atteinte au 9^e jour dépend de la dose de sucre offerte. Avec une concentration N/10 de saccharose, le *ph* atteint 4,8 ; avec une dose 10 fois moindre, on trouve au même jour 7,5.

KLOTZ (84) a étudié la nutrition azotée d'*Aspergillus niger*, *Sphæropsis malorum* Peck., *Diplodia natalensis* Pole, Evans, *Phoma betæ* Frank, sur diverses sources d'azote : NO^3K , NO^3NH^4 , $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$, peptone. Il a, dans chaque cas, déterminé le *ph* (par la méthode colorimétrique) et dosé la récolte, le sucre résiduel et l'azote sous ses différentes formes dans le mycélium et dans le liquide de culture. Avec l'*Aspergillus niger*, les résultats sont sensiblement conformes à ceux que nous connaissons déjà. Sur sels ammoniacaux, il y a acidification rapide et persistante jusqu'à *ph* 2 ou 1,7. Sur NO^3K , après une acidification initiale, le milieu s'alcalinise. De même avec la peptone, dont la consommation s'accompagne, surtout en l'absence de sucre, d'une production considérable d'ammoniaque. Avec *Diplodia natalensis*, le *ph* des milieux aux sels ammoniacaux ne descend qu'à 2,6. Les autres milieux s'alcalinisent d'une façon régulière dès le début. *Phoma betæ*, et *Sphæropsis malorum* se comportent à peu près comme *Diplodia natalensis*.

BOYLE (25) a repris les travaux de NIKITINSKY (l. c.), de LUTZ O. (106) et de KUSTER (92) sur la toxicité des vieilles cultures à l'égard des spores. Il utilise comme matériel d'études les cultures de *Fusarium sp.*, et les spores de *Botrytis cinerea*. *Fusarium sp.*, sur milieu nitraté, fait passer le *ph* de 4 à 8 et le milieu est devenu inapte à la germination des spores de *Botrytis*. En portant le milieu à l'ébullition, on atténue l'effet toxique ; le rétablissement du *ph* primitif agit dans le même sens et ces deux effets s'ajoutent, mais peuvent être insuffisants à rendre le milieu apte à la germination des spores.

PRATT (131, 132) a définitivement élucidé cette question. Les vieilles cultures alcalines sont toxiques par suite de la présence de bicarbonates alcalins. Ainsi, dans un milieu amené artificiellement à *ph* 8,2 par addition de CO^3KH , tout développement est impossible.

Ces bicarbonates se forment au cours de la culture, principalement dans la combustion des acides organiques. L'acidification artificielle, en les décomposant, détruit leur effet toxique. Cependant, en milieu acide, les cultures de *Fusarium* sont encore toxiques ; mais ici, c'est pour une autre raison. Elles contiennent des acides gras : acides acétique, propionique, butyrique, valérianique etc., qui ne sont pas toxiques à l'état de sels totalement dissociés, mais qui le deviennent à l'état d'acides libres, par le jeu de leur molécule non dissociée. Par suite, les bicarbonates alcalins qui confèrent aux cultures alcalines leur toxicité, ne peuvent être désactivés que par une acidification qui fait apparaître une autre cause de toxicité.

Enfin au moment où la rédaction de ce travail était terminée, M. TETSU SAKAMURA (165) m'a fait parvenir un travail qu'il a publié en décembre 1924, au Japon, sur l'action des milieux à effet tampon sur la culture de l'*Aspergillus niger*. Il a comparé les rendements obtenus sur milieu de PFEFFER avec NO^3NH^4 comme source d'azote et sur le même milieu additionné de sels organiques tampons : oxalate, citrate, tartrate de potasse et phosphate bipotassique. La stabilisation des milieux, même pour une espèce aussi peu sensible aux acides que l'*Aspergillus niger*, augmente considérablement les rendements, en diminuant la dissociation de l'acide minéral libéré.

La production intense d'acide oxalique, qui caractérise cette espèce, agit favorablement en augmentant le pouvoir tampon, mais défavorablement en diminuant le rendement économique. Une harmonie convenable entre le pouvoir tampon et la production d'acide oxalique est la condition d'un bon développement.

Les sels ammoniacaux utilisés comme source d'azote (nitrate, chlorhydrate, sulfate, phosphate, oxalate, citrate, tartrate) agissent de deux façons : comme tampons plus ou moins actifs et comme source d'acide libre. Des sels minéraux, c'est le sulfate qui fournit le meilleur résultat.

Bien que l'*Arpergillus niger* ait une individualité chimique bien différente de l'*Aspergillus repens*, les recherches de T. SAKAMURA confirment ainsi les résultats de mon travail, résultats dont une partie a été publiée au cours de 1924.

LES MÉTHODES D'ÉTUDE

1° L'ORGANISME ÉTUDIÉ

L'espèce que j'ai utilisée dans ces recherches a été isolée par BAINIER ; elle est conservée depuis plus de 20 ans à la mycothèque de la Faculté de pharmacie de Paris.

DE BARY (1) a le premier distingué parmi les *Aspergillus* verts à forme ascosporée, deux espèces : l'*A. glaucus* et l'*A. repens* (ce dernier distinct de l'espèce de CORDA qui n'a pas été retrouvée) qu'on différencie entre elles par la dimension de leurs ascospores, celles-ci étant plus grandes pour le type *glaucus* que pour le type *repens*.

Mais depuis cette époque, on a isolé de nombreuses espèces d'*Aspergillus* verts sexués (*Eurotium*). BAINIER (2) notamment a décrit l'*A. sejunctus*, l'*A. disjunctus*, l'*A. umbrosus*, qui se rapprochent du type *glaucus*, l'*A. mollis*, l'*A. profusus* qui se rapprochent du type *repens* et MANGIN (108) a pu réunir 22 formes différentes par des détails de forme, de structure et de culture.

De l'étude de MANGIN, il ressort que les diverses formes rencontrées n'ont que la valeur de races que l'on peut toujours rattacher soit au type *glaucus*, soit au type *repens*. Les caractères tirés du mycélium et des conidiophores sont inconstants et peuvent varier dans de larges mesures suivant les conditions de température, de milieu etc. Au contraire, les ascospores possèdent des caractères précis et constants auxquels il faut se rapporter pour classer les formes isolées.

L'espèce que j'ai utilisée possède des ascospores de $4\ \mu \times 5\ \mu$ en moyenne ; elles sont aplaties et ne présentent pas de gouttière sur leur bord marginal. Les périthèces, de couleur jaune, peuvent atteindre $100\ \mu$ de diamètre et plus. Mais leurs dimensions sont trop variables pour être retenues comme caractère distinctif. Les conidies sont lisses ou verruqueuses et ont des dimensions assez variables ; les plus grandes mesurent de $10\ \mu \times 12\ \mu$, les plus petites $4\ \mu \times 5\ \mu$. On observe généralement $4\ \mu$ 7 sur $6\ \mu$ 2. Les conidiophores sont de taille et de dimensions essentiellement variables.

(1) DE BARY, 1870. *Beitrag zur Morphologie und Physiologie der Pilze*, III, p. 1.

(2) BAINIER (G.) et SARTORY, 1911-1912. *Etude biologique et physiologique de certains Aspergillus* (Bull. Soc. mycol., XXVII, p. 346 et 453, et XXVIII, p. 257).

Ce champignon donne sur les milieux fortement sucrés, qui sont les milieux de choix, une culture débutant au deuxième jour, sous forme d'îlots blancs qui s'organisent en un voile blanc, passant rapidement au jaune d'or. Les ébauches de périthèces, sous forme de filaments spirales, sont visibles dès le quatrième jour et donnent des fruits mûrs au 6^e ou au 7^e jour. A ce moment le voile est épais, jaune d'or, souvent floconneux. Le pigment jaune n'est pas uniquement localisé sur les périthèces, mais aussi sur les hyphes mycéliennes. Les cultures âgées présentent dans certaines conditions (milieux acides) une teinte orangée, localisée aussi sur les hyphes et que MANGIN décrit comme l'apanage des formes *glaucus*. Dans le milieu de culture, il apparaît un pigment jaune fluorescent qui vire au brun madère dans les vieilles cultures, dans des conditions de réaction que je préciserai. Les espèces du type *glaucus* présentent, dans ces conditions, un pigment violet en milieu alcalin et rouge orangé en milieu acide et dont MANGIN fait un caractère spécifique. Les conidies apparaissent sur tous les milieux, mais, sur les milieux fortement sucrés, les conidiophores sont très rares ; on peut les compter à l'œil nu. Ils ne sont abondants et ne forment un gazon vert que si la pression osmotique est plus faible ou si certaines conditions de réaction sont réalisées, comme nous verrons plus loin.

2° LE MILIEU DE CULTURE

A. *Composition du milieu de culture.* — J'ai employé uniquement un milieu de culture liquide, plus simple que celui de RAULIN et dont la constante minérale se rapproche de la formule de CZAPEK.

Phosphate monopotassique	1 gr. 36	N/100
Chlorure de potassium	0,745	N/100
Sulfate de magnésie	0,492	N/500
Sulfate ferreux	0,05	
Sulfate de zinc	0,05	

Les sels utilisés sont des produits purs « pour analyse » POULENC, qui ont été recristallisés deux fois au laboratoire dans l'eau bidistillée. A cette concentration, on a une solution N/100 de phosphate de potasse et de chlorure de potassium et N/500 de sulfate de magnésie. Ces proportions sont avantageuses, comme nous verrons, pour la construction des courbes d'ajustage.

Les travaux de KLEBS (83), de MANGIN (l. c.) et nos expériences propres ont montré que l'*Aspergillus repens* ne pousse bien que sur des milieux dont la pression osmotique est élevée. J'ai réalisé cette

condition en additionnant systématiquement mes milieux de 50 gr. de NaCl par litre. Cette addition a apporté un trouble dans la mesure du *ph* par la méthode des indicateurs... J'indique plus loin comment cette erreur a pu être, suivant les cas, évitée ou corrigée.

L'aliment carboné a été, dans tous les cas, le saccharose que l'on peut facilement trouver pur dans le commerce.

Quant à l'aliment azoté, qui constitue la variable, j'ai utilisé des nitrates, des sels ammoniacaux d'acides minéraux ou organiques, des amino-acides, des amides, la peptone, à une concentration telle que le milieu soit toujours N/10 en azote ; cependant la peptone a été employée à la dose de 1 ou de 5 %, suivant que l'on ajoute ou non du sucre.

L'eau a toujours été redistillée dans un appareil en verre, en présence de bichromate de potasse. Son *ph* était égal à 6 ou 6,2. Pour la construction des étalons colorimétriques et pour les dilutions au cours des mesures, l'eau utilisée a été encore une fois redistillée sur la baryte et conservée pour l'usage en flacons de petite capacité et paraffinés. On arrive ainsi à avoir une eau de *ph* 6,6 à 6,8.

B. Détermination de la réaction des milieux. — La réaction des milieux de culture a été déterminée par la méthode colorimétrique de CLARK et LUBS (36). Les indicateurs donnent en général toute satisfaction. Dans les cultures âgées, où les pigments colorent le liquide, il faut utiliser un comparateur à 6 trous. J'ai fait construire à cet effet un appareil très simple, dérivé du comparateur de HURTWITZ, MEYER et OSTENBERG (75). C'est un bloc de bois percé de 3 séries de deux trous parallèles ; chaque série est éclairée par une fenêtre latérale. Le bloc de bois est lui-même disposé au fond d'une boîte de bois, noircie intérieurement, dont la profondeur correspond à la distance minima de la vision distincte ; le tout est monté sur un chevalet qui permet de maintenir l'appareil sous un angle de 30° par rapport à l'horizontale. Les rayons incidents sont tamisés par un verre dépoli, ou, suivant les cas, par des verres rouges ou bleus. Ce n'est que dans les très vieilles cultures que la comparaison devient impossible. Dans la zone du Bromophénol bleu notamment, on est alors gêné par le phénomène de dichroïsme signalé par CLARK (36). Le liquide paraît bleu, alors que les étalons correspondants sont violets. On arrive souvent à corriger le phénomène par l'emploi de verres rouges ou bleus.

La présence d'une forte dose de NaCl (solution environ normale) crée une cause d'erreur dans l'emploi des indicateurs, erreur connue

sous le nom d'erreur de sel. Les sels neutres modifient la concentration des ions H, mais on admet qu'ils ne troublent pas les indications de l'électrode à hydrogène, que, par convention, on considère comme exactes. Cela a permis à divers auteurs, notamment à KOLTHOF (85), de donner des tables de correction des indicateurs de CLARK et LUBS, qui sont d'ailleurs parmi les moins sensibles à cette cause d'erreur.

Dans les solutions normales ou demi normales, l'erreur est négligeable pour le Bleu de thymol et le Bleu de bromothymol. Elle a une valeur importante pour le bromophénol bleu et le bromocrésol pourpre. Il faut alors retrancher, suivant les cas, 0,35 ou 0,30 de la valeur trouvée expérimentalement. Pour le rouge de méthyl au contraire, l'erreur est positive et égale à 0,10, qu'il faut ajouter au chiffre trouvé.

Avec les milieux à effet tampon, c'est-à-dire toutes les fois que j'ai utilisé des sels d'acides organiques, j'ai dilué la solution au quart, ce qui supprime à peu près complètement l'erreur ; dans les autres cas, j'ai appliqué les coefficients de KOLTHOF, aux trois indicateurs ci-dessus.

Enfin il y a une autre cause d'erreur sur laquelle je dois attirer l'attention : on ne doit jamais filtrer au papier les cultures destinées aux mesures du *ph* sans s'être assuré que ces papiers ne modifient pas la teinte d'une solution aqueuse d'indicateur. Cette condition est rarement réalisée. Les papiers ordinaires sont très alcalins et peuvent faire commettre une erreur positive de plus d'une unité. Les papiers lavés aux acides tels que ceux que l'on utilise en analyse cèdent toujours de l'acide, malgré de minutieux lavages à l'eau distillée. Je me suis donc abstenu de filtrer les prises d'essai destinées à ces mesures, ce qui est d'autant plus facile que les liquides de culture sont généralement très clairs. Ce n'est que dans le cas des vieilles cultures que j'ai dû recourir à la centrifugation.

C. *Courbe de neutralisation des milieux.* — La détermination de la concentration initiale en ions H d'un milieu ne nous renseigne pas suffisamment sur les qualités de ce milieu. Deux solutions de même *ph* offriront aux causes d'acidification ou d'alcalinisation une résistance différente, suivant leur pouvoir tampon et la zone des *ph* où s'exerce cette qualité. J'ai donc, d'une façon systématique, construit la courbe de neutralisation de tous les milieux utilisés. Ces courbes ont été déterminées en ajoutant à 10 c. c. de milieu, des quantités croissantes d'acide ou d'alcali titrés et en notant le *ph* obtenu. On porte en ordonnées les valeurs du *ph* et en abscisses les volumes d'acide ou d'alcali utilisés.

Il convient d'examiner à ce point de vue les divers constituants du milieu. Avec l'eau pure, on obtient une courbe à deux branches représentée dans la figure 1 (courbe 1). Le saccharose qui se comporte comme un acide extrêmement faible, dont la constante de dissociation est égale à $1,14 \times 10^{-13}$ (MICHAELIS (114), n'exerce aucune action appréciable sur cette courbe.

Des constituants de la constante minérale, seul le phosphate acide de potasse joue un rôle, d'ailleurs souvent prépondérant. On a, somme toute, une solution N/100 d'acide phosphorique dont la première fonction seule est saturée. On sait que les constantes de dissociation de cet acide sont respectivement :

$$K_a = 9 \times 10^{-3} \quad K_b = 2 \times 10^{-7} \quad K_c = 3,6 \times 10^{-13} \quad (1).$$

La neutralisation de la première fonction est terminée à *ph* 4,2. C'est le *ph* d'une solution de PO^4KH^2 . Puis commence la saturation de la deuxième fonction, de 4 à 9, avec point de demi-virage à *ph* 6,69. La neutralisation de la troisième fonction commence au delà de *ph* 9, dans une région où le champignon ne pousse pas et qui ne nous intéresse pas. La courbe de neutralisation de l'acide phosphorique est représentée en 2, fig. 1. Dans la zone de *ph* 8,5 à *ph* 2, où se développe le champignon, on voit une portion de courbe ascendante de 3,5 à 6, puis une portion inclinée de 6 à 7,5 et une nouvelle branche verticale au delà de 7,5. Les portions verticales de cette courbe correspondent aux zones sans effet tampon, où la moindre addition d'acide ou d'alcali produit une variation énorme du *ph*. Dans ces régions, le milieu n'est pas « stabilisé ».

L'addition des divers composés azotés modifiera plus ou moins profondément cette courbe.

1° Les nitrates alcalins, comme NO^3K , sels d'un acide fort avec une base forte, seront sans action sur la courbe du phosphate : le milieu nitraté n'est pas stabilisé entre *ph* 3,5 et *ph* 6, qui représente précisément la zone eugénésique de l'*Aspergillus*. Son *ph* initial est voisin de 4,2-4,6 (Fig. 14-I).

2° Les sels ammoniacaux : NH^4Cl , $\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$, NO^3NH^4 , sels d'un acide fort et d'une base moyenne, ne modifient pas la courbe dans la zone acide. Le *ph* initial est encore voisin de 4,2-4,6 ; cependant l'hydrolyse de ces sels intervient dans la région voisine de *ph* 7, puis, au delà de 7, la soude utilisée dans le titrage déplace l'ammoniaque de ses sels. Or l'ammoniaque est une base faible, dont la constante

(1) Les constantes de dissociation citées dans ce travail sont empruntées, pour la plupart, à l'ouvrage de SCUDDER (155).

de dissociation : $K_b = 8 \times 10^{-5}$ est du même ordre de grandeur que celle de l'acide acétique, ce qui crée une zone tampon de *ph* 7,5 à *ph* 11, avec point de demi-virage à *ph* 9,25 (Fig. 3).

Les sels ammoniacaux d'acides faibles : PO^4H^3 , acides organiques, détermineront une courbe dont la zone tampon est comprise entre *ph* 3 et *ph* 7, c'est-à-dire dans la zone favorable au champignon.

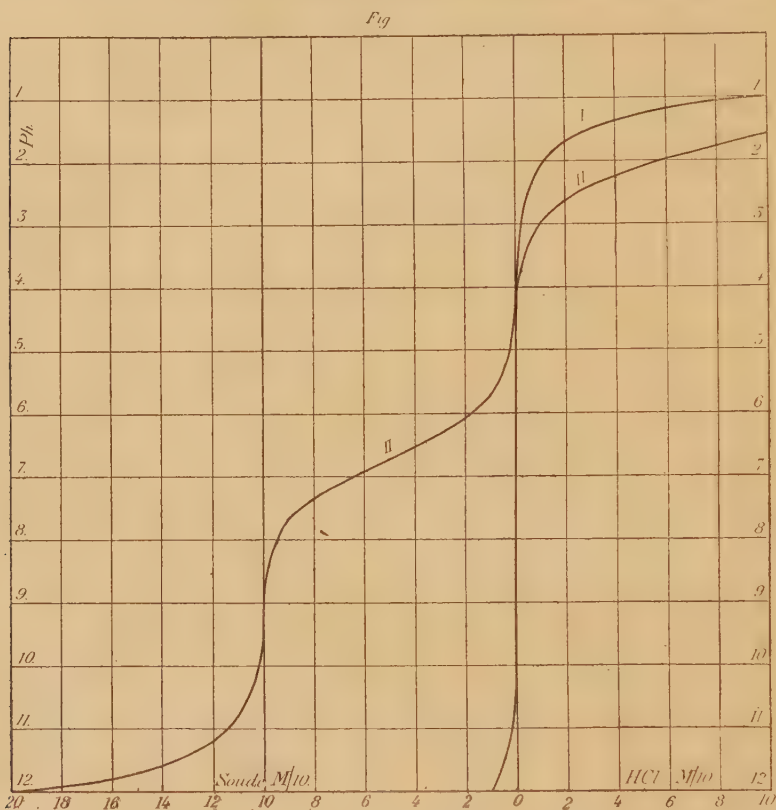


FIG. 1. — 1, Courbe d'ajustage de l'eau distillée ; 2, Courbe d'ajustage d'une solution de PO^4KH^4 .

Les courbes de neutralisation de tous les acides monobasiques ont une forme identique et sont formées de deux parties symétriques par rapport au point de demi-saturation (*ph* égal au logarithme de l'inverse de la constante de dissociation). Ce point est situé à un niveau variable sur l'échelle des *ph*, suivant la valeur de cette constante, c'est-à-dire suivant la force de l'acide. La courbe des acides

bibasiques est définie par leurs deux constantes de dissociation (MICHAELIS, *l. c.*, p. 147). Dans le milieu de culture, la courbe sera surtout sous la dépendance du sel ammoniacal, que l'on utilise à une concentration 10 fois plus élevée que PO^4KH^2 . Le *ph* initial sera le plus souvent voisin de 6 (Fig. 7-8-11).

3° Les amino-acides sont des ampholytes qui modifient peu la réaction de leur solvant. Ils présentent cependant un effet tampon à partir de *ph* 3,5, fait utilisé par SÖRENSEN pour la préparation de mélanges tampons au glycolle (Fig. 16). L'urée, les amides n'ont aucune action appréciable. La peptone possède une action tampon, variable suivant l'origine du produit (Fig. 20).

D. *Construction des courbes de neutralisation.* — Le milieu utilisé ne présentant pas d'effet tampon uniforme, il importera de ne pas le diluer au cours de ces opérations. Pour cela, on prépare le milieu à la concentration double de celle où l'on doit l'utiliser et on le répartit à la dose de 5 c. c. dans des tubes à essais de même calibre. On complète à 10 c. c. par addition d'acide ou d'alcali titrés, puis d'eau distillée. Il est bien évident que le milieu peut supporter, sans erreur notable, une addition supplémentaire de quelques dixièmes de centimètres cubes de liquide. Avec une dizaine de tubes, on peut ainsi déterminer une vingtaine de points qui suffisent à la construction de la courbe.

L'acide utilisé est toujours HCl dont la constante de dissociation est voisine de l'unité et que l'on peut considérer, sans erreur sensible, comme une solution d'ions H. Le titre N/20 est le plus favorable pour les milieux sans effet tampon. L'acide N/5 sera réservé aux autres cas, ou aux portions extrêmes de la courbe. On ne peut utiliser, comme l'ont fait certains auteurs, l'acide correspondant au sel ammoniacal, car, avec les acides faibles, on modifierait à chaque instant les propriétés tampons du milieu.

Dans les mélanges du premier type (sans tampon), la courbe sera construite jusqu'à *ph* 1,6, limite que l'*Aspergillus repens* ne dépasse jamais. Pour les milieux du deuxième type, il est inutile d'aller au delà du point obtenu en ajoutant 5 c. c. de HCl N/5 aux 5 c. c. de milieu. On a ainsi mis en liberté tout l'acide du sel ammoniacal, sous forme d'une solution N/10 et réalisé une acidité que l'organisme ne pourra dépasser. En admettant la consommation intégrale de toute l'ammoniaque, on réaliserait cette solution N/10. Une acidité plus élevée ne pourrait être obtenue que par la produc-

tion intense d'autres acides organiques, comme l'acide oxalique, ce qui n'est pas le cas.

Du côté alcalin, j'ai utilisé des solutions de soude de même titre. Elles doivent être préparées et conservées avec les précautions d'usage, avec de la soude exempte de carbonate et à l'abri de l'acide carbonique de l'air. L'emploi de flacons burette, avec ampoule de chaux sodée, est indispensable. Avec les milieux du premier type, 1 c. c. de soude N/20 donnera la demi-saturation du phosphate, c'est-à-dire le *ph* 6,69.

Au lieu de construire cette courbe expérimentalement, on pourrait la calculer aux dépens des constantes de dissociation des corps utilisés, mais le problème, facile dans le cas d'un corps unique, se complique quand on se trouve en présence de mélanges et n'a pas de solution théorique simple.

E. *Stérilisation des milieux. Vases de culture.* — La détermination du *ph* et l'ajustage, s'il y a lieu, ont été effectués après stérilisation à l'autoclave, à 110°, pendant 15 minutes. Dans ce dernier cas on utilise des solutions stériles titrées. D'ailleurs la stérilisation de ces milieux très simples ne modifie le *ph* que d'une façon insignifiante, sauf dans les milieux alcalins. Plus le milieu est doué des propriétés des tampons, moins il subit de changements à l'autoclave. Dans le cas des amino-acides, de la peptone, des amides et de l'urée, j'ai stérilisé les liquides par filtration à la bougie, avec répartition aseptique dans des vases stériles.

3° LES CONDITIONS DE CULTURE

On ne peut suivre la marche d'une culture de Mucédinée en prélevant de temps en temps une fraction du liquide de culture. Le champignon en effet ne végète pas uniformément réparti dans le liquide et, en soutirant une portion de ce dernier, on modifie le rapport qui existe entre le volume du milieu et la masse du champignon. Il est donc indispensable d'ensemencer simultanément une série de fioles qui seront retirées successivement de l'étuve. C'est la méthode qu'a généralisée BRENNER (l. c.). Mais pour qu'on puisse légitimement considérer les résultats obtenus comme les étapes d'une même culture, il faut s'attacher, avec une grande rigueur, à réaliser des conditions identiques dans tous les vases.

Les vases ont été choisis en verre neutre, de la même origine et de la même forme, pour que le liquide occupe la même hauteur et

la même surface dans tous les essais. Les fioles coniques de 250 c. c. ont été traitées, avant tout usage, par le mélange chromique à froid, pendant 12 heures. Ce traitement a été répété après chaque culture. La répartition du liquide a été faite à la pipette. L'ensemencement doit être aussi large que possible. J'ai conservé la semence sur bois de réglisse, en tubes à pomme de terre. Ce support donne une culture abondante, sous forme d'un mycélium floconneux, aérien, formé d'hyphes qui atteignent une hauteur de plus d'un centimètre au-dessus du support. Cette circonstance permet de prélever un produit très riche en conidies et n'ayant aucun contact avec le support. On évite ainsi d'introduire, avec la semence, des corps étrangers. Le contenu d'un tube, après une dizaine de jours de culture, est émulsionné dans 10 c. c. de sérum physiologique (préparé avec de l'eau bidistillée). L'émulsion obtenue est distribuée à la dose de 20 gouttes par fiole d'Erlenmeyer.

Les cultures ont été faites à l'étuve réglée à 28°-29°, température qui semble la plus favorable pour les espèces du groupe *repens*. L'*Aspergillus repens* pousse d'ailleurs bien plus lentement que le *Sterigmatocystis nigra*. Sur les milieux les plus favorables, la germination est visible à la 30^e heure, sous forme de flocons nageant dans le liquide. Le voile commence à s'organiser au troisième jour et atteint son complet développement du 8^e au 14^e jour, suivant les cas. A ce moment, le sucre étant consommé, le mycélium peut subir l'autolyse et le milieu se colore fortement.

Grâce à cette culture lente, il suffit de faire des examens toutes les 48 heures pour avoir une image suffisamment précise de l'évolution de la culture. L'expérience a été généralement interrompue au bout de 20 jours.

4^o RECHERCHES CHIMIQUES SUR LA RÉCOLTE ET LE LIQUIDE DE CULTURE

A. *Pesée de la récolte.* — Le liquide de culture, y compris les parties utilisées pour la détermination du *ph*, est jeté sur deux filtres équilibrés, disposés sur un entonnoir de JOULIE. Le mycélium est lavé par décantation, puis sur le filtre, à l'eau tiède, jusqu'à ce que l'on ait obtenu un volume total de 250 c. c. Le mycélium est alors séché à l'étuve à 37°, puis à l'étuve à eau à 100°, pendant 4 heures. On le pèse à la balance de précision, avec les précautions ordinaires.

Le filtrat de 250 c. c. sert alors aux recherches suivantes.

B. *Acidité potentielle. Pouvoir tampon.* — On détermine d'abord, sur 50 c. c. du filtrat, ou sur un volume plus considérable dans le cas des milieux non tampons, l'acidité potentielle de la culture. J'entends par acidité potentielle le volume d'acide titré nécessaire pour ramener 10 c. c. de milieu initial (soit 50 c. c. de filtrat) au *ph* du début de la culture. C'est la seule façon rationnelle de comprendre l'acidité potentielle et la seule qui donne une image précise des quantités d'acide ou d'alcali apparus dans le milieu. En comparant ces résultats avec ceux que fournit l'examen de la courbe d'ajustage, on peut voir si le pouvoir tampon du milieu a augmenté, ou diminué, ou est resté constant. Le rapport de ces deux chiffres peut fournir une expression mathématique du pouvoir tampon.

Pour que ces chiffres aient une valeur comparable, il convient que l'expression du pouvoir tampon soit calculée sur la même portion de la courbe de neutralisation. Cette portion doit être choisie aussi étendue que possible et dans une région caractéristique. Ainsi dans le cas des sels ammoniacaux d'acides faibles, nous verrons que le phénomène le plus remarquable de la culture est la consommation du radical acide. Cela se traduit par une baisse du pouvoir tampon qui sera perçue dans toute son amplitude si l'on choisit comme portion de courbe celle où l'acide exerce son action stabilisante. Ainsi, l'acide oxalique stabilise la région au-dessous de *ph* 4. Les variations de la quantité d'acide oxalique présent dans le milieu n'exerceront aucune action sur le pouvoir tampon, dans la région au-dessus de *ph* 5, par exemple, et on ne pourra tirer aucun résultat d'observations faites dans cette zone. J'indiquerai dans tous les cas la zone qui a été choisie pour ces comparaisons.

LEHMAN (95) a donné du pouvoir tampon d'un milieu une expression mathématique qui ne m'a pas paru utilisable pour les raisons que je viens d'exposer.

La méthode de titrage des acides organiques de DONALD VAN SLYKE et PALMER (167) permettrait aussi de suivre ces changements. Je ne l'ai utilisée qu'exceptionnellement et à titre de vérification. Son application systématique sort du cadre de ce travail. Elle est d'ailleurs ici compliquée par l'intervention de l'acide oxalique.

C. *Dosage de l'ammoniaque.* — L'ammoniaque a été dosée par distillation, sur 25 c. c. de filtrat, à l'aide de l'appareil de MEILLÈRE et DE ST-RAT (112), qui permet un entraînement très rapide de l'ammoniaque, grâce à un courant de vapeur d'eau. Le passage de l'ammoniaque est complet en 7 minutes et l'on peut faire

4 dosages à l'heure. L'ammoniaque est déplacée par un lait de magnésie et reçue dans 10 c. c. de HCl N/20, en présence de rouge de méthyl comme indicateur. Cet indicateur virant en dehors de la zone stabilisée par l'ammoniaque, ses indications sont nettes et le changement de teinte est précis à une goutte près. Grâce à la rapidité de l'entraînement, l'hydrolyse des composés susceptibles de fournir de l'ammoniaque est réduite au minimum. On peut d'ailleurs déterminer le chiffre de correction à appliquer, en continuant la distillation pendant un laps de temps égal et recevant l'ammoniaque formée dans 10 c. c. d'acide N/20. L'expérience m'a montré que cette correction est absolument négligeable, même dans le cas de l'urée, à condition de ne pas prolonger l'ébullition pendant plus de huit minutes.

D. *Dosage de l'azote aminé.* — Je n'ai dosé l'azote aminé que dans le cas des amino-acides utilisés comme source d'azote. La détermination a été faite sur 100 c. c. de filtrat, par la méthode de SÖRENSEN-MESTREZAT (113). Cette méthode est d'application délicate, dans le cas des liquides colorés, comme c'est ici souvent le cas. Je me suis bien trouvé de comparer les teintés au début et à la fin du titrage, à l'aide du comparateur, suivant la méthode générale utilisée dans la détermination du *ph* dans les liquides colorés.

E. *Dosage du sucre.* — Je n'ai pas cherché à suivre, d'une façon systématique, la consommation du sucre. Néanmoins il est important de voir à quel moment le sucre disparaît; c'est en effet le moment où commencent généralement les phénomènes d'autolyse et la consommation des radicaux acides. La majeure partie du saccharose, à la fin de la culture, est intervertie, grâce à l'invertine produite par le champignon. L'inversion a été complétée par l'action de l'acide chlorhydrique à 1 %, au B. M. bouillant, pendant 5 minutes, et le sucre interverti, dosé par la méthode de BERTRAND. Les résultats sont exprimés en sucre interverti.

F. *Dosage de l'acide oxalique.* — J'ai découvert que l'*Aspergillus repens* est capable de produire de l'acide oxalique dans les mêmes conditions que le *Sterigmatocystis nigra*, quoique d'une façon moins abondante. Ce corps a été dosé à l'état d'oxalate de calcium, en mettant à profit les indications de STÖHL (160). La précipitation a été faite à froid, sur 100 c. c. de filtrat, par l'acétate de calcium, en maintenant le *ph* entre 5 et 6. On abandonne le liquide 24 heures

au repos, pour assurer une insolubilisation complète et sépare le précipité par filtration. On le lave deux fois avec 20 c. c. d'eau distillée froide, puis on crève le filtre et, avec un jet de pissette, on entraîne le précipité ; on le dissout, ainsi que les traces restées sur le filtre, avec SO^4H^2 N/10, complète à 100 c. c. et dose l'acide oxalique par le permanganate de potasse à chaud.

G. *Dosage de l'azote total du mycélium.* — L'azote total de la récolte a été dosé, dans quelques cas, par le procédé de KJELDAHL, en utilisant le sulfate de cuivre comme catalyseur. L'emploi de ballons en Pyrex est particulièrement commode. L'ammoniaque a été ensuite dosée par la méthode déjà indiquée.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PREMIÈRE PARTIE

INFLUENCE DE LA PRESSION OSMOTIQUE

Avant d'aborder l'étude des divers composés azotés, il convient de justifier la méthode de culture suivie. Sans vouloir recommencer l'étude si souvent faite de l'influence des divers facteurs : température, épaisseur du liquide, dilution des aliments, etc., il m'a paru pourtant nécessaire de montrer la nécessité de l'emploi d'une forte concentration en sel marin.

KLEBS (83) a déjà signalé la nécessité de cultiver l'*Aspergillus repens* de Bary sur des solutions à haute pression osmotique. Ainsi, sur des milieux renfermant 0,2, 0,3, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15 et 20 % de glucose, le champignon n'a une évolution normale que sur les milieux à 20 % de sucre ; déjà avec 15 % la végétation est maigre. Elle le devient de plus en plus avec la diminution de la concentration. Les conidiophores prennent alors des caractères végétatifs et la culture se dégrade de plus en plus jusqu'à 0,2 %, où il n'y a plus qu'un mycélium rudimentaire.

Les sels minéraux : NO^3K , NO^3Na , NaCl se comportent de même. De plus, on peut réaliser avec ces corps des milieux à pression osmotique suffisamment élevée pour arrêter tout développement. Le nitrate de sodium à 10 % qui permet l'apparition de conidiophores normaux en 2 jours, donne à 25 % un mycélium très abondant, mais restant indéfiniment blanc ; à 37 %, la germination est suspendue.

L'apparition des périthèces est également conditionnée par la pression osmotique. Avec 20 % de glucose, il y a beaucoup de périthèces et très peu de conidies. Avec 90 %, il n'y a plus de périthèces, par contre les conidiophores sont extrêmement nombreux.

MANGIN (108) a étudié 22 formes se rattachant aux espèces *glaucus* et *repens* de DE BARY et a noté également la nécessité absolue d'employer des milieux très concentrés. Sur jus de haricots à 2 % de

glucose, la végétation est uniformément misérable et se réduit à quelques flocons sans appareils reproducteurs. Le même milieu, additionné de 20 % de glucose et de 10 % de glycérine, permet une végétation luxuriante.

KLEBS et MANGIN se sont bornés à des observations purement morphologiques. Avant d'entreprendre des cultures sur milieux liquides, j'ai fait de nombreux essais sur milieux gélés (milieu de CZAPEK) à 5 % de glucose, additionné de quantités croissantes de sels neutres. Ces expériences confirment les conclusions de KLEBS et de MANGIN.

Mais les milieux solides ne permettent pas la pesée des récoltes

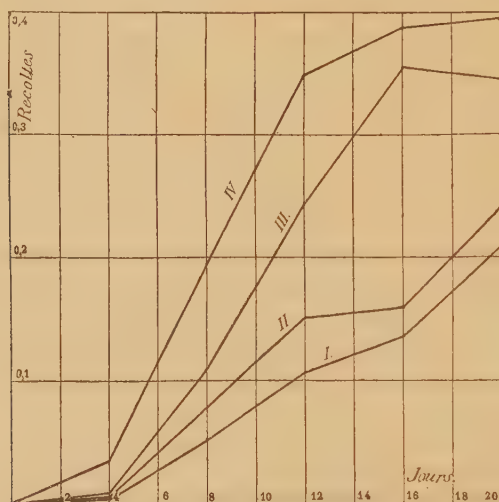


FIG. 2. — Influence de la pression osmotique sur le développement de l'*Aspergillus repens*, en présence de succinate d'ammoniaque : 1, Milieu sans NaCl ; 2, Milieu avec 1 % de NaCl ; 3, Milieu avec 2,50 % NaCl ; 4, Milieu avec 5 % NaCl.

et les indications qu'ils donnent sont insuffisantes, d'où la nécessité de cultures sur milieux liquides. Celles-ci ont été effectuées sur le milieu habituel, à 5 % d. saccharose, additionné de quantités croissantes de NaCl. La source d'azote a été, suivant les cas, soit le nitrate de potasse, soit l'asparagine, soit le succinate d'ammoniaque.

En l'absence de sel marin, la culture est réduite à des flots blancs, puis jaune sale, qui s'immergent dans le liquide et ne présentent pas généralement d'appareils reproducteurs. Avec 1 et 2,5 % de NaCl, la culture est lente à partir, mais finit par donner un déve-

TABLEAU 1

Nitrate de potasse 1,01 %
 Chlorure de sodium 0,1, 2,5, 5, 10, 15, 20 %
 PH initial 3,6

Concen- tration en NaCl		AGE DES CULTURES											
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	24
0	PH	3,6	5	5,8	6	6	6	5,9	5,9	5,4	5	4,4	0,0922
1	Récoltes			0,004	0,0238	0,0105	0,013	0,058	0,076	0,087	0,057	0,057	0,057
	PH	3,6	5,2	6	6,3	6	5,9	5,6	5,1	5,1	5,6	5,1	6,9
2,5	Récoltes			0,066	0,055	0,093	0,113	0,135	0,173	0,158	0,195	0,209	0,190
	PH	3,6	5,2	6,2	6	5,8	5,4	5,6	5,4	5,3	5,4	5,6	
5	Récoltes			0,014	0,070	0,063	0,147	0,137	0,192	0,214	0,204	0,222	
	PH	3,6	4,4	6	6,2	6	5,3	5,2	5	4,9	5,1	4,8	
10	Récoltes			0,041	0,070	0,135	0,1535	0,165	0,242	0,218	0,234		
	PH	3,6	5,2	6,6	6,2	6,4	6,1	5,4	5,9	5,4	5,2		
15	Récoltes			0,050	0,0632	0,081	0,067	0,383	0,317	0,331	0,300		
	PH	3,6	5	5,6	6,6	6,5	6,1	6,1	5,3	5,4	6,8		6,4
20	Récoltes			0,020	0,067	0,100	0,156	0,200	0,260	0,236	0,215		0,175
	PH	3,6		5,4	5,6	6,4	6	6,6	6,4	5,9	5,8	5,6	
	Récoltes				0,020	0,087	0,050	0,138	0,195	0,253	0,230		

TABLEAU 2

Asparagine 0,66 %
 NaCl 0, 1, 2,5, et 5 %
 PH initial 4,8

NaCl	AGE DES CULTURES											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	38	
0 %	PH Récolte	4,8	4,8	4,6	4,6	4,6	4,3	4	3,95	3,8	3,4	3,6
1 %	PH Récolte	4,8		4	6	5	0,0136 5,4	5,4	0,0285 5,2	0,026 5	0,008 5,1	0,0465 6
2,5 %	PH Récolte	4,8		4,4	0,0230 4,35	0,026 4,2	0,193 4,05	0,118 4,2	0,120 4,4	0,272 4,9	0,256	0,172 6
5 %	PH Récolte	4,8	4,35	4,2	0,034 5	0,078 6	0,103 5,8	0,098 6	0,326 5,6	0,290 5,4	0,295 5,4	0,3565 5,4
			0,076	0,182	0,280	0,344	0,308	0,308	0,278	0,282	0,273	0,2885

TABLEAU 3

Succinate d'ammoniaque . . . 0,76 %
 Saccharose 5 %
 Chlorure de sodium 0, 1, 2,5, 5 %

Age	NaCl 0 %			NaCl 4 %			NaCl 2,5 %			NaCl 5 %		
	PH	Récolte	Moyenne	PH	Récolte	Moyenne	PH	Récolte	Moyenne	PH	Récolte	Moyenne
0	6,2	0,024		6,2	0,0035		6,2	0,0110		6,2	0,0310	
4	6	0,0222		6,2	0,0047		6	0,0068		6	0,0292	
	6	0,011	0,019	6	0,0056	0,0046	6	0,0074	0,0084	6	0,0195	0,0266
	5,8	0,0300		6	0,0713		5,6	0,1125		5,4	0,1785	
8	5,85	0,0563		6	0,0665		5,4	0,1530		5,4	0,2102	
	5,85	0,0745	0,0539	5,4	0,0955	0,0777	6,2	0,0605	0,109	5,4	0,1915	0,1934
	5,6	0,0988		5,6	0,1334		5,3	0,2335		5,2	0,3925	
12	5,7	0,0960		5,8	0,1876		5,4	0,2025		5,2	0,3590	
	5,45	0,1251	0,1066	5,7	0,1346	0,1518	5,3	0,295	0,2437	5,2	0,2935	0,3483
	5,2	0,079					5,6	0,4195		5,6	0,3855	
16	5,1	0,1580		5,4	0,1652		5,6	0,342		7	0,3840	
	5,25	0,1645	0,1336	5,6	0,1495	0,1573	5,3	0,306	0,3558	5,6	0,3925	0,3873
							8,5	0,335		6,8	0,3992	
20	6,8	0,2605		8,4	0,2021		8,5	0,3386		7	0,3754	
	5,4	0,1588	0,2096	7,6	0,2990	0,2505	7,6	0,3642	0,3459	8	0,405	0,3932

loppement aussi abondant qu'avec 5 %. La production des conidies est ici favorisée, aux dépens des périthèces ; enfin on observe une sécrétion intense de pigments solubles.

Avec 5 % de sel, la culture est très rapide ; le voile blanc organisé dès le troisième jour, devient jaune d'or et ne se couvre de conidies vertes que lorsque l'on revient dans la zone neutre pour *ph* 6.

Aux concentrations plus fortes, la culture est plus lente à partir, mais elle finit par donner des chiffres plus élevés. Le voile, d'abord d'un blanc pur, se couvre ensuite de conidies vertes et ne jaunit que tardivement. La sécrétion des pigments solubles est presque entièrement suspendue et les milieux restent indéfiniment incolores.

Il ne semble pas que la pression osmotique ait une influence marquée sur la variation de la réaction (Fig. 2), page 42.

DEUXIÈME PARTIE

ASSIMILATION DE L'ION AMMONIACAL

L'ammoniaque constitue probablement la forme sous laquelle les végétaux doivent obligatoirement assimiler l'azote. D'autres formes de l'azote : azote nitrique, azote aminé et amidé, azote protéique peuvent servir aux végétaux à couvrir leurs besoins en azote et avec d'excellents résultats, mais c'est à la suite de remaniements préalables qui les amènent précisément sous la forme d'ammoniaque. De même, de nombreux sels ammoniacaux semblent de mauvais aliments à côté de ces formes complexes ; mais il ne faut pas perdre de vue que l'acide du sel ammoniacal peut être toxique de diverses façons.

Les sels ammoniacaux subissent en solution une dissociation qui est pratiquement totale et, l'absorption se faisant vraisemblablement sous la forme d'ions, la valeur alimentaire de tous les sels ammoniacaux doit être identique. La cellule végétale n'a pas à effectuer un travail différent suivant les cas. Mais par suite de phénomènes secondaires, l'acide libéré dans le milieu de culture modifie immédiatement la concentration des ions H de ce milieu. S'il s'agit d'un acide fort et que rien ne s'oppose à sa dissociation, la concentration de H prendra rapidement des valeurs dysgénésiques. S'il s'agit d'un acide faible, peu dissocié, il ne produira pas, du moins chez les champignons, une concentration de H toxique, mais la molécule non dissociée peut exercer à son tour une action néfaste. Enfin l'anion peut être lui-même défavorable et, par suite de la dissociation totale des sels ammoniacaux, exercer son action avant toute assimilation. Dans ce cas, le sel ammoniacal est toxique d'emblée, mais sa qualité de sel ammoniacal n'est pas en jeu dans ce phénomène.

Ces considérations montrent que ces composés doivent être étudiés en plusieurs groupes, d'après la nature de l'acide. C'est ainsi que j'envisagerai successivement les acides minéraux forts et faibles, les acides de la série acétique, de la série oxalique, les acides alcools simples et complexes, avec un certain nombre de types dans chaque cas.

CHAPITRE PREMIER

SELS AMMONIACAUX D'ACIDES MINÉRAUX FORTS.

Dans ce groupe, j'ai étudié NH_4Cl , $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, et NO_3NH_4 . Ce dernier mérite d'ailleurs une étude spéciale, à cause du radical nitrique.

J'ai assez longuement insisté plus haut sur les travaux effectués sur les corps de ce groupe, pour qu'il ne soit pas nécessaire d'y revenir. Seuls, les champignons capables de supporter de fortes concentrations de l'ion H pourront donner de bons résultats avec ces corps. L'*Aspergillus niger* possède cette propriété à un très haut degré. Par contre, les champignons sensibles à l'acidification ne donneront avec eux que des résultats médiocres. Tel est le cas des Mucorinées (HAGEM, l. c.) ou des *Actinomyces* étudiés par WAKSMAN (l. c.). L'*Aspergillus repens* occupe à ce point de vue une situation intermédiaire.

CHLORHYDRATE D'AMMONIAQUE. — P. M. 53,5.

On utilise 5,35 de sel par litre. HCl est l'acide le plus fort connu. Sa constante de dissociation est voisine de l'unité. Dans les conditions de dilution où l'on opère, on peut admettre que la dissociation de l'acide mis en jeu est totale, à moins d'emploi de substances « tampons ». Le milieu initial a un *ph* voisin de 4,2. La courbe d'ajustage (Fig. 3-1) présente une zone faiblement infléchie entre 6 et 8 (due au phosphate), puis, à partir de 8, une zone très infléchie due à l'action tampon de l'ammoniaque. Mais entre 6 et 3, c'est-à-dire dans la zone la plus favorable, la solution n'est pas stabilisée. Il est facile de prévoir qu'un tel milieu ne pourra donner que des résultats médiocres : pour une formation de mycélium, même très faible, il y aura production d'une quantité d'acide suffisante pour amener le champignon hors de la zone favorable.

Des essais préalables montrent que les conidies peuvent germer depuis *ph* 2,8 jusqu'à *ph* 8,4. Mais entre 2,8 et 3,4, on n'obtient que des germinations irrégulières aboutissant à des cultures très maigres. De même, entre *ph* 6,5 et *ph* 8,4, les germinations sont très lentes, mais finissent pourtant par donner des cultures plus abondantes

qu'avec tout autre milieu. C'est entre ph 3,4 et ph 6,5 que se place l'optimum pour la germination, mais non pour la culture, car, ici



FIG. 3. — Courbe d'ajustage des milieux aux sels ammoniacaux des acides forts : 1, Chlorhydrate d'ammoniaque ; 2, Sulfate d'ammoniaque ; 3, Chlorhydrate d'ammoniaque + citrate de soude.

encore, le champignon sort trop vite de la zone favorable. Ces essais montrent en tout cas que le rendement de la culture dépend de la réaction initiale.

A. *Cultures sur milieux à ph variés.* — J'ai préparé une série de milieux, dont les *ph* vont en décroissant de *ph* 8 à *ph* 3,6. Le tableau 4 donne les résultats numériques de ces cultures arrêtées au dixième jour. On y voit l'amélioration des rendements au fur et à mesure que le milieu initial est moins acide, c'est-à-dire offre au végétal une zone plus longue à parcourir avant d'atteindre la région où l'ion H a une concentration toxique. La culture la plus alcaline (*ph* 8) est toutefois en retard, car la culture a été longue à partir ; quand le *ph* limite sera atteint, vers le 14^e jour, la récolte s'élèvera à 0,20 environ. L'aspect macroscopique est intéressant à examiner. Les cultures 1, 2 et 3 sont formées de flocons glaireux, immergés, qui, au microscope, sont formés de cellules géantes, sans appareils reproducteurs. Dans les autres vases, la culture a un aspect à peu près normal, mais présente cependant de nombreuses cellules géantes.

La valeur alimentaire du chlorhydrate d'ammoniaque est donc fonction du *ph* initial. J'ai été ainsi amené à suivre son assimilation sur trois séries de milieux différents seulement par leur réaction initiale. Les résultats sont indiqués dans les tableaux 5, 6 et 7.

Les résultats des séries 5 et 6 sont ce que pouvaient nous faire prévoir les essais préliminaires. Les cultures ont montré les caractères décrits plus haut. A la fin de l'expérience, le liquide était fortement coloré en jaune fluorescent.

TABLEAU 4

NH ⁴ Cl.	0,535 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

N ^o	PH initial	PH final	Récolte	Observations
1	3,6	2,4	0,031	Quelques flocons glaireux immergés formés de cellules géantes.
	3,6	2,2	0,030	
2	4	2,5	0,034	id.
	4	2,6	0,030	
3	5	2,1	0,063	Quelques îlots jaunes, nombreuses cellules géantes.
	5	2,1	0,065	
4	6	2,1	0,077	id
	6	2	0,096	
5	7	2,2	0,135	Voile formé de placards jaunes réunis par une trame blanche. Quelques conidiophores. Des cellules géantes.
	7	2,2	0,170	
6	8	2,4	0,141	id.
	8	2,6	0,118	

TABLEAU 5

NH⁴Cl. 0,535 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 4

Age	PH	Récoltes	Acidité potentielle		Ammoniaque consommée
			calculée	trouvée	
0	4				
2	3,8				
4	2,5	0,0305	0 c. c. 75	0 c. c. 65	0 c. c. 65
6	2,5	0,0531	0,75	0,85	0,75
8	2,5	0,0665	0,75	0,80	0,70
10	2,4	0,0810	0,90	1	1,05
12	2,4	0,0593	0,90	0,90	1,15
14	2,4	0,0593	0,90	0,95	0,90
16	2,2	0,1025	1,25	1,30	1,20
18	2,2	0,0950	1,25	1,20	1,15
20	2,3	0,0755	1,1	1	1

TABLEAU 6

NH⁴Cl. 0,535 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 5,4

Age	PH	Récoltes	Acidité potentielle		Ammoniaque consommée
			calculée	trouvée	
0	5,4				
2	3,7				
4	2,6	0,0207	0,70	0,60	0,55
6	2,4	0,0651	0,90	1,05	0,95
8	2,2	0,0855	1,30	1,65	1,10
10	2,6	0,0335	0,70	0,70	0,60
12	2	0,1366	1,85	1,80	1,75
14	2,1	0,1204	1,45	1,70	1,45
16	2	0,1275	1,85	1,80	1,45
18	2	0,1270	1,85	1,90	1,45
20	2	0,1160	1,85	1,75	1,70

TABEAU 7

NH ⁴ Cl.	0.535 %
Saccharose	5 %
PH initial	7,8

Age	PH	Récoltes	Acidité potentielle		Ammoniaque consommée
			calculée	trouvée	
				(1)	
0	7,8				
2	7,4				
4	7,2				
6	6,8	0,0166	0,50	0,50	0,45
8	5,4	0,0374	1	0,95	0,85
10	3,8	0,0992	1,15	1,20	1,20
12	3,3	0,1075	1,25	1,30	1,60
14	2,3	0,1755	2,2	2,2	2,25
16	2,4	0,1716	2,0	2	2,05
18	2,3	0,1825	2,35	2,20	2,25
20	2,3	0,1790	2,35	2,20	1,90
22	2,3	0,1725	2,35	2,30	2,20

La série 7 présente une allure tout à fait différente. Elle est lente à partir, car la zone alcaline où végète d'abord le champignon est assez longue à franchir, à cause de l'effet tampon du phosphate, puis brusquement, vers le huitième jour, on assiste à un développement rapide, mais qui amène aussitôt le champignon hors de la zone favorable. A ce moment, on a un voile jaune d'or, virant à l'orangé, avec de nombreux périthèces en voie d'organisation et pas de cellules géantes. Celles-ci n'apparaîtront qu'une fois la zone *ph* 3 à *ph* 3,6 franchie.

(1) L'acidité potentielle indiquée dans ces tableaux est le nombre de centimètres cubes de soude N/10 nécessaires pour ramener 10 c. c. du milieu au *ph* initial. J'ai mis en regard la quantité d'ammoniaque disparue au cours de la culture, pour 10 c. c. de milieu et exprimée en centimètres cubes de solution N/10. Ce chiffre peut également être considéré comme représentant l'acide chlorhydrique libéré dans le milieu. Si la consommation de l'ammoniaque est la seule cause d'acidification de ces cultures, les deux colonnes devront être identiques. De même, l'acidité potentielle calculée sur la courbe d'après la variation du *ph* observée sera exprimée par des chiffres analogues, si aucune cause ne vient troubler le pouvoir tampon du milieu.

Le poids de la culture se maintient constant et mes résultats ne montrent avec certitude ni des phénomènes d'autolyse, ni une diminution de l'acidité actuelle. L'examen des chiffres obtenus pour l'acidité potentielle et pour l'ammoniaque disparue est très instructif:

1° L'acidité potentielle calculée sur la courbe et que j'appellerai acidité théorique, correspond très sensiblement à celle de mes déterminations.

2° Les chiffres de l'ammoniaque disparue et par suite de l'acide libéré sont du même ordre de grandeur que les précédents.

Cela prouve que l'acidification de la culture est due uniquement à l'acide chlorhydrique.

B. *Cultures sur milieux citratés.* — Les cultures précédentes ont montré que la valeur alimentaire du chlorhydrate d'ammoniaque dépend du *ph* initial. Les expériences qui vont suivre sont destinées à montrer qu'il suffit d'employer des milieux stabilisés pour voir cette valeur s'améliorer. J'ai utilisé comme tampon le citrate trisodique, qui, grâce aux trois fonctions acides de l'acide citrique, couvre toute la zone de végétation de l'*Aspergillus* (Fig. 3-3). Une dose de 0,50 % suffit largement et l'on pourrait certainement la réduire.

Le citrate de soude ne joue qu'un rôle de présence et non un rôle alimentaire, tout au moins au début de la culture. L'acide citrique est en effet un mauvais aliment pour l'*Aspergillus*, qui ne donne avec lui et en l'absence de sucre, qu'une récolte misérable (0,04 à 0,07 centg. après 15 jours de culture). En présence de sucre, il est protégé contre toute attaque tant qu'il reste une dose suffisante d'hydrate de carbone. Cependant, celui-ci disparu, le mycélium vigoureux qui s'est développé peut utiliser la molécule citrique et l'on assiste alors à deux phénomènes distincts : diminution du pouvoir tampon, alcalinisation du milieu. Nous verrons de nombreux exemples de ces réactions dans l'étude des acides organiques.

L'examen de ces trois séries de cultures permet de constater l'amélioration considérable apportée par la présence d'un régulateur. Dans la série 8, on sort assez vite de la zone eugénésique et le mycélium présente les déformations habituelles aux milieux acides : masses glaireuses immergées, formées de cellules géantes, avec de rares conidiophores. La culture possède encore au 20^e jour plus de la moitié du sucre offert.

La série 9 présente une culture normale, avec un voile organisé dès le quatrième jour, devenant au huitième épais, floconneux, jaune d'or ; les hyphes sont normales et il y a une infinité de péri-

TABLEAU 8

NH ⁴ Cl.	0,535 %
Saccharose	5 %
Citrate de soude.	0,5 %
PH initial	3,6

Age	PH	Récoltes	Acidité potentielle	Ammoniaque consommée
0	3,6			
3	3,6			
4	3,4			
5	2,9	0,060		
6	2,5	0,076	1,15	1,4
8	2,5	0,090	1,20	
10	2,2	0,125	1,30	
12	2,4	0,140	1,60	2,2
14	2,3	0,095	2	
16	2,3	0,166	2	2,5
18	2,4	0,123	1,7	2

TABLEAU 9

NH ⁴ Cl.	0,535 %
Saccharose	5 %
Citrate de soude.	0,50 %
PH initial	5

Age	PH	Récoltes	Acidité potentielle	Ammoniaque consommée
0	5			
2	4,9			
4	4	0,077		
6	2,8	0,179	2,8	2,80
8	2,7	0,213	2,95	2,95
10	3,2	0,250	2,4	2,80
12	2,5	0,345	3,3	3,7
14	2,5	0,345	3,2	
16		0,298	3,4	3,45
18	2,5	0,337	3,45	3,5
20	3,2	0,291	3,2	3,75

thèses à tous les stades. Au 18^e jour, il ne reste que des traces de sucre (0,107) et l'attaque de la molécule citrique commence, se traduisant par une régression du *ph*.

La série 10, avec un début plus lent, dont nous connaissons maintenant la raison, présente dans l'ensemble une évolution analogue.

TABLEAU 10

NH ⁴ Cl.	0,535 %
Saccharose	5 %
Citrate de soude	0,50 %
PII initial	8

Age	PH	Récoltes	Acidité potentielle	Ammoniaque consommée
0	8			
2	7,6			
4	7,2			
6	6,3	0,039	0,85	0,85
8	5,3	0,080	1,7	
10	4,9	0,140	2,2	2,3
12	4,6	0,190	2,5	2,5
14	4,5	0,225	2,5	2,75
16	4,5	0,228	2,5	2,75
18	4,5	0,250	2,6	2,6
20	4,4	0,251	2,8	3,27
22	6,4	0,371	0,5	3,9

J'ai dosé l'azote total du mycélium à divers stades, dans ces deux dernières séries. Les chiffres obtenus, qui seront discutés plus loin, montrent une diminution très nette de l'azote total avec l'âge de la culture, ce qui est l'indice des processus de protéolyse qui se manifestent de bonne heure.

TABLEAU 11

Age de la culture	6	8	10	12	14	16	18	20
	%	%	%	%	%	%	%	%
Azote total : Série 9 . . .	6,43	5,33	5,30	5,16	5,05	5,27	4,50	5,52
Azote total : Série 10 . . .	7,96		5,35	5,04	4,37	5,31	4,92	5,10

Il est intéressant de mettre en regard de ces chiffres l'azote ammoniacal disparu. On obtient ainsi, pour la série 10 par exemple, les chiffres du tableau suivant où j'ai fait le rapport de l'azote fixé à l'azote ammoniacal disparu. Même dans les cultures très jeunes, l'azote fixé ne dépasse pas la moitié de l'azote consommé. L'autre moitié représente sans doute des stades intermédiaires entre l'ammoniaque et la matière protéique : azote aminé, amidé, peptique etc., sous une forme soluble. Ce rapport semble s'améliorer avec l'âge, malgré les processus de protéolyse qui ont pour effet de diminuer le numérateur et d'augmenter le dénominateur. Il serait intéressant de rechercher la nature et les destinées de cette sorte d'albumine circulante ; mais c'est tout le problème de la synthèse protéique. J'ai d'ailleurs retrouvé le même rapport dans la série 9 et avec les milieux non citratés.

TABLEAU 12

Age	6	10	12	14	16	18	20
Azote total %	7,96	5,35	5,04	4,37	5,31	4,91	5,10
Azote du mycélium en mm.	3,1	7,40	9,57	9,83	12,1	12,27	14,18
Az. ammoniacal disparu	3,95	16,1	17,2	21	19,3	18,2	28,2
Rapport : N fixé	0,52	0,46	0,56	0,46	0,63	0,66	0,68
N consommé							

SULFATE D'AMMONIAQUE. — P. M. 134. $Ka = 4,5 \times 10^{-1}$. $Kb = 1,7 \times 10^{-2}$.

La première fonction de l'acide sulfurique est celle d'un acide très fort, la deuxième, avec son point de demi-saturation à ph 2,77, correspond à un acide déjà moins dissocié. La courbe de neutralisation traduira cette propriété par une inflexion plus marquée à partir de ph 3 (Fig. II-2). Par suite, le champignon doit pouvoir consommer une dose de sel ammoniacal légèrement plus élevée qu'avec le chlorhydrate avant d'atteindre le ph limite et, par suite, fournir une récolte quelque peu supérieure.

Comme pour le sel précédent, j'ai fait des cultures sur milieux stabilisés et non stabilisés et dans les mêmes conditions de réaction initiale (Tab. 14, 15, 16, 17, fig. 4 et 5).

TABLEAU 13

Sulfate d'ammoniaque 0,67 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

PH initial.....	3,6	4	5	6	7	8
PH final a..	2,1	2	1,9	1,7	1,75	2
b.	2,1	2,1	1,9	1,7	1,8	2,1
Récoltes..... a..	0,058	0,085	0,175	0,187	0,200	0,126
b.	0,075	0,085	0,153	0,195	0,172	0,125

Ici encore, les résultats sont d'autant plus favorables que le milieu initial est moins acide, c'est-à-dire que le milieu peut supporter une dose plus forte d'acide, avant d'atteindre les régions dysgénésiques.

Les hautes concentrations en ions H produisent les mêmes déformations morphologiques que ci-dessus.

TABLEAU 14

Sulfate d'ammoniaque 0,67 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 4

Age	PH (1)	Récolte	Acidité potentielle		Ammoniaque consommée
			calculée	trouvée	
0	4				
2	3,9				
4	3,2	0,0110	0,20	0,30	0,30
6	2,9	0,0210	0,40	0,40	0,55
8	2,4	0,0660	1,00	1,15	1,20
10	2,2	0,0871	1,40	1,30	1,50
12	2,4	0,0670	1,00	0,90	1,05
14	2,2	0,0910	1,40	1,20	1,50
16	2,2	0,108	1,40	1,40	1,70
18	1,9	0,1185	2,30	2	2,10
20	2	0,1072	2	2	2,15

(1) Voir fig. 4.

TABLEAU 15

Sulfate d'ammoniaque 0,67 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 5,4

Age	PH	Récolte	Acidité potentielle		Ammoniaque consommée
			calculée	trouvée	
0	5,4				
2	4,6				
4	3,4	0,0146	0,25	0,30	0,30
6	2,9	0,0220	0,50	0,55	0,50
8	2,3	0,0705	1,25	1,35	1,40
10	2,2	0,0840	1,50	1,50	1,70
12	2,1	0,0960	1,75	1,80	1,65
14	1,9	0,1220	2,40	2,40	2,30
16	2,2	0,1116	1,50	2,10	2,10
18	1,9	0,1115	2,40	2,30	2,05
20	2,1	0,1095	1,75	2,10	1,95

TABLEAU 16

Sulfate d'ammoniaque 0,67 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 7,8

Age	PH	Récolte	Acidité potentielle		Ammoniaque consommée
			calculée	trouvée	
0	7,8				
2	7,6				
4	7,2	0,0070	0,25	0,30	
6	3,2	0,043	1,30	1,20	1,30
8	2	0,148	2,90	2,70	2,70
10	1,9	0,175	3,50	3,45	3,45
12	1,9	0,226	3,50	3,45	3,45
14	1,85	0,236	3,65	3,65	3,45
16	1,85	0,230	3,65	3,85	3,65
18	1,8	0,223	4	3,8	3,85
20	1,8	0,240	4	3,90	3,95

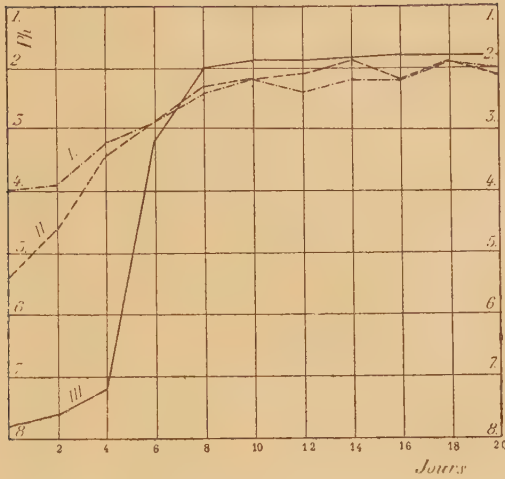


FIG. 4. — Variations du pH sur milieux au sulfate d'ammoniaque. 1, pH initial 4 ; 2, pH initial 5,4 ; 3, pH initial 7,8.

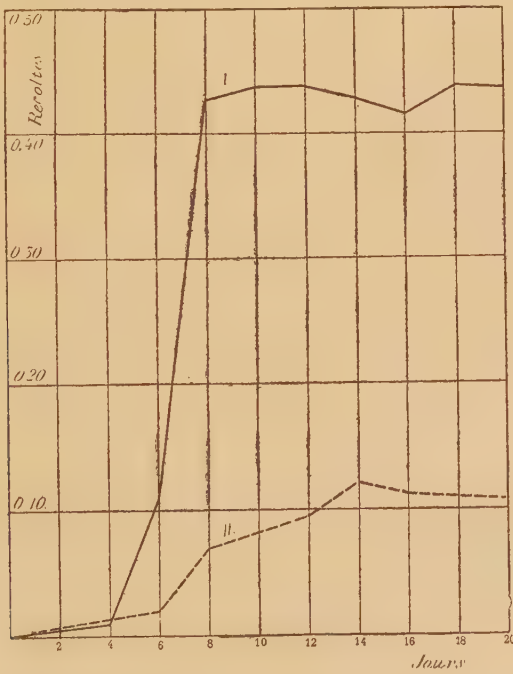


FIG. 5. — Influence du pouvoir tampon : 1, Culture sur sulfate d'ammoniaque seul ; 2, Culture sur sulfate d'ammoniaque + citrate de soude.

TABLEAU 17

Sulfate d'ammoniaque	0,67 %
Saccharose	5 %
Citrate de soude	0,50 %
PH initial	3,6 5,6 7,6

Age	PH initial 3,6		PH initial 5,6		PH initial 7,6	
	PH	Récolte	PH	Récolte	PH	Récolte (1)
0						
2	3,5		5,7		7,2	
4	2,6	0,0495	5,4	0,0095	6,3	0,003
6	2,2	0,122	4,3	0,107	5,6	0,045
8	2,1	0,145	1,9	0,324	4,9	0,130
10	2	0,1676	1,9	0,427	4	0,257
12	2	0,173	2	0,437	4,8	0,164
14	2	0,185	1,9	0,428	4,6	0,200
16	1,9	0,188	2,8	0,415	4,5	0,219
18		0,181	2,8	0,439	4,4	0,210
20			2,8	0,435	2,0	0,240

Le sulfate d'ammoniaque est donc un aliment sensiblement supérieur au chlorhydrate. Les milieux non stabilisés fournissent des récoltes qui peuvent atteindre 0,240. J'ai obtenu la même concordance entre l'acidité potentielle déterminée expérimentalement et mesurée sur la courbe, ou calculée d'après les chiffres de l'ammoniaque consommée. Dans aucun cas, je n'ai obtenu de régression du *ph*, ce qui permet de penser que dans ces conditions : 1° il n'y a pas de protéolyse ; 2° il n'y a pas de consommation d'acides organiques, réaction qui est la cause la plus habituelle de l'alcalinisation des cultures.

Les expériences sur milieux citratés fournissent des récoltes très élevées. De plus, dans une série au moins, on a observé une régression très nette du *ph*, correspondant à un début de consommation de l'ion citrique. L'expérience a été interrompue trop tôt pour voir jusqu'où pouvait aller cette régression. Mais nous verrons plus loin d'autres expériences analogues, où ce processus aboutit à une réaction franchement alcaline. La diminution de l'acidité ne s'est pas accompagnée ici d'une diminution du poids de la récolte, bien qu'il n'y ait plus de sucre. Cela tient à ce que nous ne sommes pas dans

(1) Voir fig. 5-2.

la zone d'action des protéases. Ce point de vue sera d'ailleurs discuté plus loin.

Les dosages de sucre résiduel présentent aussi un intérêt particulier. Ainsi dans la culture 16, le sucre reste constant à partir du 14^e jour. On a donc un mycélium de champignon de poids considérable et dont la respiration, se traduisant par l'attaque du sucre, se trouve à peu près suspendue. On peut y joindre le fait que le champignon a organisé son mycélium en consommant une dose de sucre inférieure à celle qui lui est nécessaire dans d'autres conditions. Il semblerait donc que le champignon vit plus économiquement sur milieux très acides. Il y a là toute une série de faits qui sortent du cadre de notre travail et qui mériteraient d'être repris. Ils sont à rapprocher des conclusions déjà anciennes de JAVILLIER (76), sur l'action favorable qu'exerce le zinc sur le coefficient d'utilité spécifique du sucre et de l'azote. Ces coefficients sont améliorés par la présence de zinc, qui, d'autre part, n'exerce son action qu'en présence des sels ammoniacaux, c'est-à-dire en milieu devenu très acide. STEINBERG (158) a précisément montré que l'augmentation de l'acidité jouait le même rôle dans les phénomènes de stimulation que l'addition de zinc.

Enfin, puisque les résultats plus favorables donnés par le sulfate d'ammoniaque sont dus au fait que l'acide sulfurique est moins dissocié que HCl, on peut prévoir qu'en augmentant la dose de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)^2$ et par suite le léger effet tampon du milieu, on améliorera encore la récolte. C'est ce que la série suivante montre assez nettement.

TABLEAU 18

Sulfate d'ammoniaque 1,34 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 8

Age	2	4	6	8	10	12	16	18	20
PH	7,6	4	5,8	3	2,8	2	2	1,9	1,8
Récoltes ...			0,0545	0,1168	0,1760	0,2865	0,2830	0,3285	0,3353

CHAPITRE II

SELS AMMONIACAUX D'ACIDES MINÉRAUX FAIBLES.

PHOSPHATE D'AMMONIAQUE. — J'ai choisi comme type le phosphate d'ammoniaque, sous la forme de phosphate acide PO_4H^2 (NH_4) de P. M. = 115. Ce sel renfermant un seul atome d'azote, je l'ai utilisé à la dose de 1,15 %. La courbe de neutralisation du milieu ne diffère de celle de la constante minérale que par un effet tampon beaucoup plus accentué entre *ph* 8 et *ph* 5. La zone *ph* 5 à *ph* 4 est mal stabilisée (Fig. 6).

Les résultats des cultures sur ces milieux sont résumées dans les tableaux ci-dessous. Je n'ai pas préparé de milieu à *ph* supérieur à 7, à cause de la précipitation abondante de phosphate ammoniacomagnésien qui se produit dans ces conditions. L'ajustage a été obtenu du côté acide par HCl N/2, du côté alcalin par la soude de même titre.

TABLEAU 19

Phosphate d'ammoniaque	1,15 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

N°	PH initial	PH final	Récolte	Observations
1	3,2	3,2 3,2	0,010 0,066	Cult. misérable, immergée, glaireuse, cellules géantes, liquide incolore.
2	3,6	3,1 3,2	0,056 0,059	id.
3	4	3,2 3,2	0,059 0,060	Voile glaireux blanc, immergé, sans appareils reproducteurs.
4	5	3,2 2,9	0,093 0,175	Voile jaune, glaireux, partiellement immergé.
5	6	2,4 2,8	0,286 0,230	Voile épais jaune d'or.
6	7	6,4 6,4	0,080 00,95	Voile mince fragile, formé d'îlots verts, réunis par une légère trame jaune.

Les cultures 1, 2, 3 et 4 sortent très rapidement de la zone favo-

nable, à cause de l'absence d'effet tampon dans la région 4-5 ; leur aspect misérable indique que le mycélium subit l'effet d'un toxique. Il semble probable que la partie non dissociée de PO_4H_3 joue un certain rôle dans ces phénomènes. La dernière culture est visiblement en retard et n'a pas atteint la zone favorable. On remarquera l'aspect tout particulier du voile, où les îlots apparus tout d'abord sont couverts de conidies, alors que les parties nouvellement organisées en milieu plus acide, ne possèdent plus de conidies, mais des ébauches de périthèces.

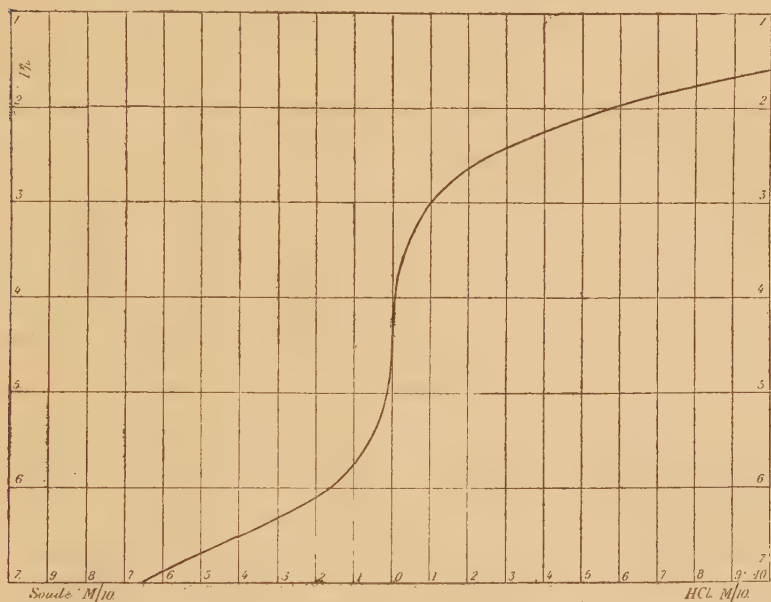


FIG. 6. — Courbe d'ajustage des milieux au phosphate d'ammoniaque.

Les expériences 20 et 21 ne présentent rien de particulier. Le *ph* baisse régulièrement et, à la fin de la culture, il reste une dose notable de sucre. Il y a concordance assez régulière entre l'acidité de titrage et l'ammoniaque disparue. Par contre, la série 22 a une allure très caractéristique. La culture, lente à partir, se présente d'abord sous forme d'un voile vert, mince (au 4^e jour) devenant rapidement épais et jaune d'or. Le *ph* minimum (4,8 au 10^e jour) est atteint au moment de la consommation presque intégrale du sucre. Il y a ensuite une alcalinisation très nette du milieu, avec une diminution du poids des récoltes par protéolyse.

TABLEAU 20

Phosphate d'ammoniaque 1,15 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 4,1

Age	PH	Récolte	Acidité potentielle	Ammo- niaque consommée
0	4,1			
2	3,85			
3	3,4			
4	3,4	0,0370	0,8	0,80
5	3,1	0,0580	1,1	1,25
6	3,1	0,049	1	
8	2,9	0,065	1,3	
10	2,9	0,0585	1,2	1,25
12	2,9	0,053	1,3	1,30
14	2,9	0,056		1,30
16	2,9	0,054	1,2	1,40
18	2,9	0,048	1,2	1,35

TABLEAU 21

Phosphate d'ammoniaque 1,15 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 6

Age	PH	Récolte	Acidité potentielle	Ammo- niaque consommée
2	6			
3	5,7			
4	5,5	0,040	1,40	1,35
5	4	0,081	2,10	2,35
6	3,8	0,092	2,2	
8	3,6	0,100	2,4	2,7
10	2,8	0,210	3,4	3,4
12	2,6	0,282	4,2	4,5
14	2,8	0,168	3,2	3,8
16	2,9	0,230		4,2
18	2,6	0,256	4,2	4,05

On remarquera la discordance qui existe dans cette série, entre

TABLEAU 22

Phosphate d'ammoniaque 1,15 %
 Saccharose 5%
 PH initial 7

Age	PH	Récolte	Acidité potentielle	Ammoniaque consommée
2	6,95			
3	6,9			
4	6,8	0,030		
5	6,5	0,105	3,5	3,05
6	6,1	0,1655	5	3,5
8	5,3	0,290	6	3,7
10	4,8	0,328	6,8	5,90
12	5,4	0,365	6,4	6,05
14	5,6	0,304	6	5,90
16	5,8	0,275	8	5,75
18	5,6	0,291	7,2	5,85
20	5,6	0,329	8	5,70

TABLEAU 23

Phosphate d'ammoniaque 1,15 %
 Saccharose 2 %
 PH initial 7

Age	PH	Récolte	Acidité potentielle	Ammoniaque consommée
2	7,1			
4	6,7	0,047	1,6	
6	6,6	0,057	1,6	1
8	6,2	0,160	3,2	2,40
10	5,8	0,152	5,5	2,45
12	6,4	0,150	6,6	2,95
14	6	0,108	8	3,55
16	6,1	0,108	»	3,45
20	6,2	0,116	7,8	3,10
22	6,4	0,108		3,40

l'acidité potentielle et les chiffres tirés de la consommation de l'ammoniaque. L'acidité potentielle est constamment plus élevée. On

peut admettre qu'il y a formation d'acides organiques aux dépens du sucre ; on se trouve dans la zone des *ph* où cette formation est la règle et j'ai montré plus loin que l'*Aspergillus repens* était capable de donner dans ces conditions de l'acide oxalique. L'alcalinisation qui intervient au dixième jour correspond à la consommation de ces acides organiques ou à la protéolyse. Dans les autres séries, le *ph* est trop bas pour permettre une intervention active de ces deux causes d'alcalinisation et l'acidité maxima, une fois réalisée, ne baisse pas.

Des cultures en présence de doses réduites de sucre (2 %) se comportent de même. La discordance est encore plus nette, car, grâce à une formation de mycélium plus restreinte, le champignon reste toujours dans la zone favorable à la production d'acide oxalique.

CHAPITRE III

SELS AMMONIACAUX DES ACIDES GRAS.

Les acides de la série acétique sont des acides faibles, peu dissociés, qui stabilisent une région des *ph* généralement comprise entre 3 et 6, c'est-à-dire dans la zone la plus favorable à l'*Aspergillus repens*. On pourrait donc penser que leurs sels ammoniacaux sont de bons aliments. Cela n'est vrai que dans certaines circonstances.

CZAPEK (*l. c.*), en particulier, a constaté que l'*Aspergillus niger* ne pousse pas sur les sels ammoniacaux de cette série, de l'acide formique à l'acide cœnanthylique. Il attribue le fait à la faible dissociation de ces composés qui ne fournit pas au champignon une quantité suffisante d'ions NH^4 . Comme BRENNER l'a fait remarquer, c'est une explication totalement erronée, puisque d'un côté les sels ammoniacaux, sels d'une base assez forte, sont complètement dissociés en solution aqueuse et que d'autre part, si une portion des ions NH^4 est absorbée, d'après la loi d'action de masse, il doit s'en reformer autant aux dépens de la molécule.

D'ailleurs BRENNER (*l. c.*) qui a repris les expériences de CZAPEK a obtenu de bons résultats avec le formiate et l'acétate ; cependant l'iso-valérienolate s'est montré toxique.

D'autre part, la toxicité élevée de l'acide acétique est connue depuis longtemps. Dès 1896, KAHLENBERG et TRUE (*l. c.*) l'attribuent à la fraction de l'acide à l'état moléculaire et ce résultat a été confirmé par tous les auteurs qui se sont occupés de ces corps, que ce soit CLARK (34), KIESEL (81), REICHEL (142) avec les spores de champignon, BETTINGER et DELAVAL (10) avec les Mucors industriels, ROSENBLATT et ROSEN BAND (149), JOHANNES SOHN (78) avec les levures, PAUL, BIRSTEIN et REUSS (128), WOLF et SHUNK (178) avec les bactéries. Cependant, d'après BIAL (11), ces corps exerceraient sur la fermentation alcoolique une action uniquement en rapport avec leur constante de dissociation.

OVERTON (127) a montré que les acides gras pénètrent à l'état moléculaire dans la cellule, grâce à leur solubilité dans les lipoides de la membrane protoplasmique. Cette action va de pair avec leur

solubilité dans l'éther ; elle explique leurs propriétés fixatrices et par suite leur toxicité pour la cellule.

AUBEL 1920 (5) donne le premier le *ph* des solutions expérimentées ; les solutions d'acide formique à 0,105 millimolécules pour 10 c. c. et de *ph* 4,3, celles d'acide acétique à 0,10 millimolécules pour 10 c.c. et de *ph* 4,7 sont infertiles pour le *Bacillus pyocyaneus*. Mais AUBEL commet l'erreur d'attribuer cette toxicité au reste acide.

De ce court historique, il ressort donc deux faits :

1° Toxicité élevée des solutions d'acides gras, due à leur faible dissociation et au pouvoir toxique de la molécule non ionisée.

2° Absence de toxicité des sels correspondants, en relation avec leur ionisation complète.

Mais ces expériences sont entourées d'une certaine imprécision, due au fait que l'on a utilisé des corps au sein de solutions complexes, de réaction et de pouvoir tampon variables, si bien que l'état réel des composés est inconnu et que les chiffres donnés n'ont qu'une valeur relative, quand ils ne sont pas complètement erronés. C'est ainsi que KIESEL (l. c.) a trouvé que l'acétate de soude était toxique pour l'*Aspergillus niger*. Mais il l'emploie en solution dans le liquide de RAULIN qui renferme une grande quantité d'acide tartrique libre, si bien qu'il a eu affaire à un mélange *acide acétique* + *acétate*.

J'ai expérimenté dans cette série, avec les acides formique, acétique, propionique, butyrique et caproïque. Mes expériences ont débuté avec l'acétate d'ammoniaque (BACH 8) et c'est elles que j'exposerai tout d'abord.

ACÉTATE D'AMMONIAQUE. — $\text{CH}_3\text{-COO NH}_4$. P. M. 77

$$K_a = 1,8 \times 10^{-5} \quad \log \frac{1}{K_a} = 4,74.$$

Le sel pur du commerce a été recristallisé. J'ai préparé d'abord une solution-mère normale d'acétate d'ammoniaque qui a été titrée en dosant l'ammoniaque par distillation. J'ai vérifié, d'autre part, que par addition d'un demi-volume de HCl normal, on avait une solution de *ph* = 4,75. Cette solution-mère a servi à préparer le milieu de culture à la concentration habituelle N/10. Son *ph* initial est de 6,2. La courbe de neutralisation est symétrique par rapport au point de demi-virage 4,75. Toute la zone de végétation est pratiquement stabilisée (Fig. 7-2).

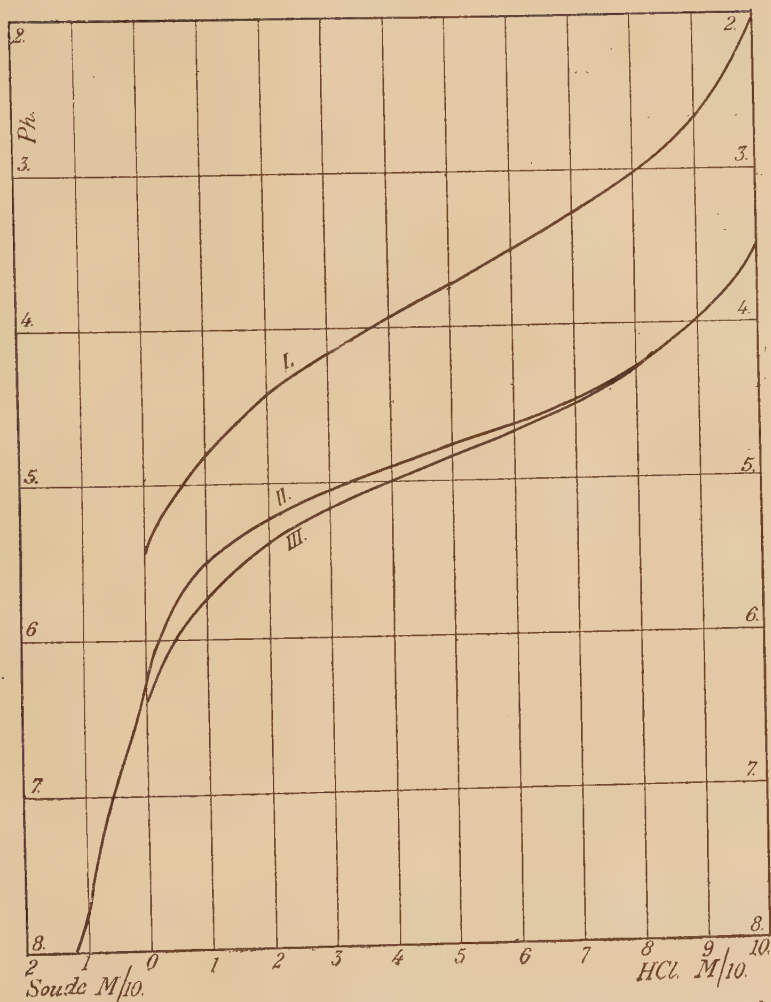


FIG. 7. — Courbe d'ajustage des milieux aux sels ammoniacaux de la série acétique : 1, Formiate d'ammoniaque ; 2, Acétate d'ammoniaque ; 3, Propionate d'ammoniaque.

1) Cultures sur milieux à pH étagés.

TABLEAU 24

Acétate d'ammoniaque.	0,77 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

PH initial.....	6,2	5,2	4,8	4,4	4	3,6
PH final	a) 6,4	6,6	id.	id.	id.	id.
	b) 6,6	5	»	»	»	»
Récoltes	a) 0,271	0,095	0	0	0	0
	b) 0,369	0,020	0	0	0	0

L'acétate d'ammoniaque se comporte donc, en milieu neutre, comme un excellent aliment, mais pour peu que le milieu soit acidifié, la culture cesse brusquement. Cet arrêt n'est pas dû à la concentration des ions H, car on est fort loin de la concentration limite. C'est ici qu'intervient la toxicité de la molécule non ionisée. L'acétate d'ammoniaque est pratiquement ionisé en totalité, en solution aqueuse, en ions NH_4^+ et ions $(\text{CH}_3\text{-COO})^-$, qui ne sont pas toxiques. Mais si l'on ajoute de l'acide chlorhydrique à ce milieu, l'acide acétique est déplacé et comme il est peu dissocié, le milieu s'enrichit en molécules $(\text{CH}_3\text{-COOH})$ non ionisées.

La quantité des molécules non ionisées présentes dans la solution est une fonction du *ph*. Dans un mélange d'acide acétique et d'acétate de soude, MICHAELIS (l. c., p. 41) appelle *Degré de dissociation* α le rapport des ions acides s , à la masse totale M des radicaux acides, quelle que soit leur forme, et *Reste de dissociation* q le rapport des molécules non dissociées (sh), à la masse totale des radicaux acides M .

$$(1) \quad \alpha = \frac{s}{M} \qquad (2) \quad q = \frac{(sh)}{M}$$

D'autre part, la masse totale des radicaux acides est la somme des parties dissociées s et non dissociées (sh).

$$M = s + (sh)$$

Or la loi d'action de masse permet d'écrire, en appelant K la constante de dissociation de l'acide :

$$(4) \quad K = \frac{s \times h}{(sh)}$$

L'expression (1) devient ainsi :

$$(5) \quad \alpha = \frac{s}{s + \frac{(s \times h)}{K}} = \frac{1}{1 + \frac{h}{K}}$$

Cette équation permet de calculer, à chaque instant, la valeur du degré de dissociation d'un acide en fonction de la concentration des ions h , c'est-à-dire en fonction du *ph*. Dans la notation du *ph*, l'expression (5) devient :

$$(6) \quad a = \frac{K}{K + 10^{-ph}}$$

Le reste de dissociation q se déduit facilement de a , en remarquant que $q = 1 - a$

$$(7) \quad q = \frac{10^{-ph}}{K + 10^{-ph}}$$

Ces équations permettent de construire les courbes représentatives de ces deux valeurs en fonction du ph . Elles permettent aussi, une fois connue la valeur du reste de dissociation q , de calculer la concentration C des molécules non ionisées pour chaque concentration d'acide :

$$(8) \quad C = q \cdot n$$

si n égale la concentration moléculaire.

Le nombre des molécules non ionisées présentes dans un milieu augmente donc quand le ph diminue (acidification) et diminue lorsque, à ph constant, on fait décroître la concentration globale de l'acide. Ces notions importantes n'avaient pas jusqu'ici été suffisamment mises en lumière. Elles permettent notamment d'expliquer les résultats de CZAPEK autrement que par une erreur d'expérience, comme a semblé le dire BRENNER (*l. c.*). CZAPEK a utilisé l'acétate d'ammoniaque à une concentration supérieure à la mienne (1 %). D'autre part, il y a dans le commerce des sels acides qui renferment à la place d'une molécule d'eau de cristallisation une molécule d'acide acétique. Ces solutions peuvent avoir un ph égal à 4,8 et se trouver ainsi dans la zone toxique. BRENNER a pris soin de préparer extemporanément le sel neutre dont il s'est servi, ce qui lui a donné un milieu de ph 6 environ.

Il reste à vérifier par l'expérience la valeur de ces déductions. Pour cela, j'ai préparé des milieux de concentrations variées en acétate, suivant la progression géométrique :

N/2,5 N/4 N/6,3 N/10 N/16 N/25 N/40 N/63 N/100

Pour chacune de ces concentrations j'ai préparé des milieux à ph variés, de façon que la concentration des molécules non ionisées oscille autour de 0,025 M, car le milieu qui a vu l'arrêt de la culture a une concentration de cet ordre de grandeur. Les valeurs de q ont été calculées à l'aide de l'équation (7), en adoptant comme valeur de la constante de dissociation de l'acide acétique $K = 1,8 \times 10^{-5}$. On admet qu'elle ne varie pas dans les limites de dilution utilisées. En multipliant ces valeurs par un facteur convenable pour chaque dilution, on obtient la concentration de l'acide moléculaire dans

chaque cas. Ces calculs peuvent se disposer sous la forme d'une table à double entrée. Par convention les valeurs de q ont été rapportées à 100.

PH	6,4	6,2	6	5,8	5,6	5,4	5,2	5	4,8	4,6	4,4
Q	2,2	3,4	5,27	8,1	12,3	18,1	25,9	35,8	46,7	58,3	69
PH	4,2	4	3,8	3,6	3,4	3,2					
Q	77	84,8	89,8	93	95,6	97,23					

Concen- tration moléculaire	N/2,5	N/4	N/6,3	N/10	N/16	N/25	N/40	N/63	N/100
Facteur N à utiliser	0,40	0,25	0,16	0,10	0,062	0,04	0,025	0,016	0,010

La limite infertilisante a pu être trouvée dans tous les cas, sauf dans la dernière série, où, comme il est facile de le prévoir, il n'est pas possible, même en mettant tout l'acide acétique en liberté, de réaliser une concentration suffisante de molécules non ionisées. D'ailleurs aux environs de cette limite supérieure, l'effet toxique de l'ion h et le manque d'azote viennent troubler l'allure du phénomène. On remarquera la netteté de la limite : une culture négative succédant souvent à une culture normale (Tableau 25).

Il est intéressant de réunir côte à côte les concentrations et les ph ayant permis, puis supprimé la culture (Tableau 27).

La concordance entre les diverses séries est remarquable. La dose infertilisante d'acide à l'état moléculaire pour l'*Aspergillus repens* est ainsi comprise entre 0,015 M et 0,029 M par litre. Il faut surtout retenir que, suivant les cas, la limite de germination des conidies peut être ph 3 ou ph 6,4.

On remarquera également, dans tous les cas, l'alcalinisation précoc du milieu, indice de la consommation de l'ion acétique.

TABLEAU 25

Acétate d'ammoniaque. variable
Durée 10 jours.

Con- centra- tions	PH initial	PH final	Conc. Acide non dissocié (1)	Récolte	Observations
N/2,5	6,4	6,35	0,88	0,001	Petits îlots blancs.
	6,2	6,2	1,36	0,001	id.
	6	6	2,12	0	néant
	5,8	5,8	3,24	0	
N/4	6,2	7,4	0,85	0,112	Voile épais jaune d'or.
	6	7,2	1,32	0,087	id.
	5,8	»	2,02	0	néant
	5,6	»	3,07	0	id.
N/6,3	5,8	7,2	1,3	0,152	Voile épais, jaune, floconneux.
	5,6	5,6	1,97	0	néant
	5,4	»	2,88	0	id.
	5,2	»	4,2	0	id.
N/10	5,4	6	1,8	0,013	Quelques îlots blancs.
	5,2	»	2,6	0	néant
	5	»	3,58	0	id.
	4,8	»	4,67	0	id.
N/16	5,2	5,8	1,62	0,162	Voile jaune épais, floconneux.
	5	»	2,23	0	néant
	4,8	»	2,91	0	id.
	4,6	»	3,60	0	id.
N/25	4,8	2,8	1,86	0,235	Voile jaune épais.
	4,6	3	2,30	0,152	id.
	4,4	»	2,70	0	néant
	4,2	»	3,10	0	id.
N/40	4,8	2,8	1,17	0,210	Voile jaune d'or.
	4,4	2,9	1,75	0,138	Voile incomplet, orangé.
	4	»	2,12	0	néant
	3,8	»	2,24	0	id.
N/63	4	3,2	1,36	0,112	Voile incomplet, jaune d'or.
	3,8	3,8	1,43	0,004	Début de voile blanc.
	3,6	3,6	1,48	0	Début de germination.
	3,4	»	1,53	0	néant
N/100	4	2,8	0,85	0,107	Voile jaune, mince, glaireux.
	3,8	2,8	0,90	0,102	id.
	3,6	3	0,93	0,030	Voile aranéeux, mince.
	3,4	3,4	0,95	0,005	id.

(1) D'après les indications données plus haut, ces chiffres représentent la concentration moléculaire centésimale de l'acide non dissocié. Ainsi le chiffre 0,84 indique que dans 100 c. c. de milieu, il existe une quantité d'acide acétique non dissocié représentée par 0 cc. 84 d'une solution normale,

TABLEAU 26

Concentrations de l'acétate d'ammoniaque		N/2,5	N/4	N/6,3	N/10	N/16	N/25	N/40	N/63
Dernière culture positive	PH	6,2	6	5,8	5,4	5,2	4,6	4,2	3,4
	C	1,36	1,3	1,3	1,8	1,62	2,3	1,75	1,4
Première culture négative	PH	6	5,8	5,6	5,2	5	4,4	4	3,2
	C	2,12	2	1,9	2,6	2,23	2,7	2,12	1,5

2) Cultures sur milieu normal.

J'ai fait une série de cultures sur le milieu N/10, dans les conditions habituelles. Les résultats sont indiqués au tableau 27 (1).

TABLEAU 27

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle
0	6,2		
1	6,2		
2,6	6,2		
4	6,6	0,0195	
6	6,8	0,0800	7,6
8	6,7	0,2811	4
10	5	0,4238	1,7
12	6,7	0,3261	2,6
14	6,4	0,3878	2,7
16	6,2	0,2939	2,7
18	7,2	0,2450	4,65
20	6,7	0,2755	3,7

On obtient dès le 4^e jour un voile blanc, qui, au 8^e, est jaune, épais, plissé, puis se couvre de conidies, à partir du 10^e jour. Le *ph* monte

(1) Dans ce tableau et dans les suivants, je donne les chiffres de l'ammoniaque résiduelle et non ceux de l'ammoniaque consommée. Il ne peut plus être question, dans ces cultures, d'un changement d'acidité dû uniquement à la consommation de l'ammoniaque. Au contraire, les variations de l'ammoniaque dans le milieu de culture présentent un intérêt particulier du fait que la protéolyse augmente souvent cette ammoniaque. On peut d'ailleurs, par une simple soustraction, calculer l'ammoniaque disparue. Les chiffres donnés correspondent à des centimètres cubes de solution N/10 et pour 10 c. c. de milieu initial.

d'abord jusqu'à *ph* 6,8, au 6^e jour. Cette alcalinisation initiale est très nette. Elle doit être due à la consommation précoce de l'ion acétique par le champignon. Au dixième jour, il y a une brusque acidification, qui correspond au maximum de la récolte et à la consommation presque intégrale du sucre, de l'ammoniaque et même du reste acétique. A ce moment commence la protéolyse, accompagnée de ses manifestations habituelles : perte de poids du mycélium, gain du liquide en ammoniaque, alcalinisation. Dans cette expérience le *ph* n'a pas dépassé 7,2. Dans une autre série, j'ai obtenu *ph* 8,6, au 25^e jour.

L'alcalinisation initiale en présence de l'acétate d'ammoniaque se retrouve chez tous les acides gras expérimentés et avec ces corps seulement. Elle est au moins inattendue, quand on songe au pouvoir toxique considérable de ces corps. REICHEL (*l. c.*) a déjà signalé le même phénomène chez un *Penicillium* et attribue la consommation précoce de l'acide acétique à une réaction générale de défense de l'organisme contre une substance toxique. Une conception si étroitement finaliste n'est évidemment guère soutenable. Pour moi, je pense que ce phénomène est lié à la propriété que possèdent les molécules d'acides gras de passer à travers la membrane et de pénétrer dans le suc cellulaire plus rapidement sans doute que le sucre ou les produits d'attaque du sucre.

L'acétate d'ammoniaque nous apparaît ainsi comme un aliment d'une nature toute spéciale par sa toxicité et sa valeur alimentaires également remarquables, ces deux propriétés étant sous la dépendance étroite de la réaction du milieu. Nous allons retrouver des faits analogues avec les homologues de l'acide acétique.

FORMIATE D'AMMONIAQUE. — H-COONH^4 . P. M. 63.

$$\text{Ka} = 2,1 \times 10^{-4} \quad \log. 1/\text{Ka} = 3,678$$

L'acide formique est un acide sensiblement plus fort que l'acide acétique (Fig. VII-1). J'ai utilisé le sel ammoniacal qui m'a servi à préparer une solution-mère normale, ajustée par dosage de l'ammoniaque par distillation. J'ai vérifié que la solution, à demi neutralisée, avait un *ph* égal à 3,67. Un essai préliminaire m'a montré que la culture s'arrêtait à *ph* 4,6, dans le milieu N/10 en formiate. La valeur correspondante du reste de dissociation est de 0,0105. L'acide formique est donc sensiblement plus toxique que l'acide acétique, mais la constante de dissociation étant plus élevée, la concentration infertilisante n'est pourtant réalisée que pour un *ph* plus bas.

TABLEAU 28	Formiate d'ammoniaque	0,63 %
	Saccharose	5 %
	PH initial	5,6

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle
1	5,55		
2	5,8		
4	6,6	0,0039	8,4
6	6,55	0,0446	8,4
8	5,8	0,1515	7,3
10	6,6	0,1555	7,3
12	6,6	0,2961	4,25
14	6,8	0,3041	4,25
16	6,4	0,2442	4,7
18	7,6	0,2469	4,95

TABLEAU 29	Formiate d'ammoniaque	variable
	Saccharose	5 %
	Durée	10 jours.

Concentrations en formiate	PH initial	PH final	Concent. de la partie non ionisée	Récolte	Observations
N/3,125	5,6	7	0,38	0,048	Voile jaune d'or avec îlots verts apparus en dernier lieu. id. néant
	5,4	7,2	0,57	0,095	
	5,2	7	0,96	0,048	
	5	5	1,44	0	
N/10	5	6,8	0,45	0,120	Voile complet jaune avec îlots verts. id. ? id. ?
	4,8	6,8	0,70	0,112	
	4,6	4,6	1,05	0	
	4,4	»	1,53	0	
	4,2	»	2,31	0	
N/31,25	4,6	5	0,33	0,308	Voile jaune épais, pas de cellules géantes. id. id. néant id.
	4,2	3,1	0,74	0,189	
	4	3,6	1,03	0,195	
	3,8	»	1,37	0	
	3,6	»	1,74	0	
N/100	4,6	3,8	0,105	0,152	Voile jaune orangé, périthèces, pas de cellules géantes. Voile glaireux, cellules géantes. id. id.
	3,8	3,1	0,429	0,098	
	3,6	2,8	0,546	0,072	
	3,4	2,8	0,65	0,070	
	3,2	2,8	0,75	0,058	

J'ai préparé, comme dans le cas précédent, des milieux de concentrations décroissantes, mais en me contentant d'un nombre de dilutions moins élevé. C'est ainsi que j'ai utilisé les concentrations :

N/3,125 N/10 N/31,25 N/100.

Enfin l'évolution de la culture a été suivie sur un milieu N/10 comme d'habitude. Les résultats de ces cultures montrent que le formiate d'ammoniaque se comporte comme l'acétate, tant au point de vue du mécanisme de la toxicité qu'à celui de l'alcalinisation précoce des cultures.

PROPIONATE D'AMMONIAQUE. $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COO NH}^4$ P. M. 91

$Ka = 1,5 \times 10^{-5}$ $\log. 1/Ka = 4,82$

Le sel ammoniacal a été préparé extemporanément par mélange de solutions titrées d'ammoniaque et d'acide propionique. Le *ph* initial du milieu est 5,4. Le point de demi-saturation de l'acide propionique 4,85, et celui de l'acide acétique : 4,74 sont très voisins, aussi leurs courbes de neutralisation sont presque superposables (Fig. 7 3). J'ai fait avec le propionate d'ammoniaque les mêmes recherches de toxicité qu'avec le formiate. L'acide propionique est sensiblement plus toxique que ses deux homologues inférieurs. Ainsi dans les milieux N/10, la culture s'arrête dès *ph* 5,6, pour une concentration d'acide moléculaire égale à 0,0143 M. Dans les milieux favorables, la récolte s'élève à des chiffres relativement élevés. On remarquera que ces chiffres sont fournis par les milieux N/10 et N/31,125. La série N/3,125 fournit des résultats médiocres. On pourrait invoquer une action toxique propre de l'anion ; je ne le pense pas. Dans ces milieux, le champignon a constamment végété entre *ph* 6 et *ph* 7, c'est-à-dire dans une zone des *ph* peu favorable, retardant toujours la culture (Tab. 30 et 31).

TABLEAU 30

Propionate d'ammoniaque . . . 0,91 %
Saccharose 5 %
PH initial 6,2

Age	2	3	4	6	8	10	10	14	16	18
PH	6,3	6,4	6,4	6,4	6,4	6,5	7,1	6,9	6,7	6,9
Récolte ...				0,005	0,002	0,012	0,034	0,035	0,015	0,097

TABLEAU 31

Propionate d'ammoniaque . . . variable
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

Concen- trations	PH initial	PH final	Concent. de la par- tie non ionisée	Récolte	Observations
N/3,125	7	7,2	0,211	0,097	Voile glaireux, sans cellules géantes.
	6,8	7,2	0,320	0,068	id.
	6,6	7,2	0,512	0,030	id.
	6,4	6,4	0,832	?	Quelques flocons blancs.
	6,2	6,2	1,31	0	néant
N/10	6,4	6,1	0,26	0,233	Voile complet jaune.
	6,2	7	0,41	0,070	Ilots vert cendré.
	6	6,8	0,62	0,135	id.
	5,8	6,1	0,95	0,001	Flocons blancs.
	5,6	5,6	1,43	0	néant
N/31,25	5,6	3,4	0,457	0,078	Voile jaune avec des plages vertes.
	5,4	3,2	0,672	0,225	id.
	5,2	5	0,947	0,094	Voile jaune pâle.
	5	5	1,27	0	néant
N/100	4,8	2,9	0,513	0,078	Ilots vert jaunâtre, cellules géantes.
	4,6	2,9	0,627	0,079	Ilots vert olive, cellules géantes.
	4,4	2,9	0,727	0,058	id.
	4,2	4,2	0,808	0	néant

BUTYRATE D'AMMONIAQUE. $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO-NH}_4$. P.M.105

$Ka = 1,6 \times 10^{-5}$ $\log. 1/Ka = 4,796$

J'ai utilisé l'acide du commerce avec lequel j'ai préparé extemporanément le butyrate d'ammoniaque, par mélange de solutions équimoléculaires d'acide et d'ammoniaque. La constante de dissociation et, par suite, la courbe de neutralisation sont presque identiques à celles du propionate d'ammoniaque. L'acide butyrique est très toxique et, dans un essai préliminaire, le milieu N/10 ne donne de culture que pour *ph* 7, encore cette culture est-elle extrêmement longue à partir. Dans ces conditions, je me suis contenté des dilutions inférieures : N/31,25 et N/100, qui ont fourni des récoltes rela-

tivement abondantes. Voilà donc un corps qui, par les méthodes ordinaires, aurait été considéré comme impropre à toute culture : en abaissant sa concentration, on en fait un aliment relativement bon ; en alcalinisant le milieu, on arrive au même résultat (Tab. 32).

TABLEAU 32

Butyrate d'ammoniaque variable
Saccharose 5 %
Durée 10 jours.

Concentrations	PH initial	PH final	Concent. de la partie non ionisée	Récolte	Observations
N/31,25	6,4	5,1	0,083	0,133	Voile blanc verdâtre, conidiophores, ébauches de périthèces.
	6,2	4,7	0,131	0,167	id.
	6	6,1	0,196	0,013	Collerettes blanc verdâtre.
	5,8	5,6	0,304	?	Quelques flocons.
	5,6	»	0,45	0	néant
N/100	5,8	4,6	0,095	0,120	Voile jaune orangé.
	5,6	4,6	0,143	0,089	Voile mince jaune d'or.
	5,4	5,4	0,21	0,001	Ilots blancs, minces.
	5,2	5,3	0,296	0,001	id.

CHAPITRE IV

SELS AMMONIACAUX DES ACIDES BIBASIQUES.

Les acides bibasiques de la série grasse sont, au point de vue physiologique, bien différents des acides monobasiques. Ils ne sont que peu ou pas toxiques et certains d'entre eux, comme l'acide oxalique ou l'acide succinique, sont des produits fréquents du métabolisme. Par leur double fonction, ce sont des acides moyens et faibles, le plus dissocié étant l'acide oxalique. La portion de l'échelle des *ph* qu'ils stabilisent est plus ou moins étendue suivant l'éloignement des deux fonctions acides, mais couvre généralement toute la zone de végétation de l'*Aspergillus repens*.

On peut donc s'attendre à voir leurs sels ammoniacaux constituer de bonnes sources d'azote. CZAPEK (*l. c.*) les a utilisés jusqu'à l'acide adipique et tous lui ont fourni, en présence de sucre, d'excellentes récoltes, ce qu'il attribue à leur forte dissociation. Mais en l'absence de toute autre source de carbone, les résultats deviennent très mauvais et la récolte se réduit à quelques centigrammes. Ce n'est pas que les champignons soient incapables de consommer ces molécules; RAVIN (138), qui a cultivé le *Penicillium glaucum* sur milieu de RAULIN où l'aliment carboné était représenté uniquement par des acides organiques libres, dont l'acide oxalique et l'acide succinique, a obtenu des rendements excellents, tout au moins avec le deuxième de ces corps. Mais lorsque le sel ammoniacal doit servir à la fois d'aliment carboné et azoté, l'assimilation du carbone l'emporte de beaucoup en intensité sur les besoins en azote; il s'ensuit une alcalinisation du milieu rendant toute culture impossible.

BUTKEWITSCH (30), EMMERLING (62), NIKITINSKY (*l. c.*) WEHMER (176) ont obtenu de bons résultats soit avec l'oxalate, soit avec le succinate, mais aucun n'a fait une étude d'ensemble du groupe.

Les acides libres, d'après KAHLLENBERG et TRUE (*l. c.*), ne sont toxiques que dans la mesure où ils fournissent des ions H. Ainsi l'acide oxalique, très dissocié, a une toxicité de l'ordre de celle de l'acide sulfurique. NIKITINSKY, KIESEL confirment ces résultats avec les spores d'*Aspergillus niger*. Ce qui donne un intérêt particulier à ces faits, c'est la production d'acide oxalique par beaucoup de champignons. Néanmoins on n'arrive jamais, comme on l'a cru longtemps (KUNSTSMAN 91), à rendre le milieu toxique.

J'ai expérimenté avec les corps de ce groupe, de l'acide oxalique à l'acide subérique.

OXALATE D'AMMONIAQUE. $\text{COO NH}^+ \text{COO NH}^+$ P.M. 124.

$$\begin{array}{ll} \text{Ka} = 3,8 \times 10^{-2} & \text{Kb} = 4,9 \times 10^{-5} \\ \log. 1/\text{Ka} = 1,420 & \log. 1/\text{Kb} = 4,31 \end{array}$$

L'oxalate d'ammoniaque est très facile à obtenir cristallisé à un très grand état de pureté. L'acide oxalique, par sa première fonction, est un acide presque aussi dissocié que l'acide sulfurique. Par sa deuxième fonction, c'est un acide faible. La courbe de neutralisation montre qu'entre *ph* 5 et *ph* 6, la stabilisation du milieu est peu accusée. Le *ph* initial du milieu est 5,4 (fig. VIII, 1).

Les essais préliminaires du tableau 33, sur milieux à *ph* étagés de 2,6 à 8,4, montrent que la culture s'arrête à *ph* 4 (Récolte 0,004 au dixième jour). On ne peut invoquer ici la toxicité de l'ion H. L'acide oxalique a donc une action propre que mettent encore en évidence les autres résultats. Dans les autres vases, la culture se présente sous forme d'îlots jaunes, compacts, épais, bien différents du voile obtenu généralement. D'autre part, on n'observe pas de cellules géantes et nous savons que celles-ci nous apparaissent comme le témoin spécifique de l'intoxication par les ions H. Le chiffre des récoltes est relativement faible et la recherche du pouvoir tampon montre que la molécule oxalique n'a pas été touchée.

Par quel mécanisme l'acide oxalique est-il toxique ? Le phénomène est plus complexe que dans le cas des acides gras. L'acide oxalique se dissocie en deux phases et chaque phase atteint une constante de dissociation particulière. La première phase met en liberté des ions (H) et (SH) suivant l'équation $\text{SH}^2 = (\text{SH}) + (\text{H})$ si (S) égale le radical (COO-COO). La deuxième phase fournit des ions (S) et (H) suivant l'équation $(\text{SH}) = (\text{S}) + (\text{H})$. On peut définir, comme dans le cas des acides monobasiques, un degré de dissociation (a_1) (a_2) de chaque phase et un reste de dissociation (q) qui sera le rapport de l'acide à l'état moléculaire, à la masse totale de l'acide sous ses différentes formes. Ces valeurs, d'après MICHAELIS (l. c., p. 47), ont pour expression :

$$(1) \quad a_1 = \frac{1}{1 + \frac{h}{k_1} + \frac{k^2}{h}} \qquad (2) \quad a_2 = \frac{1}{1 + \frac{h}{k_2} + \frac{h^2}{k_1 k_2}}$$

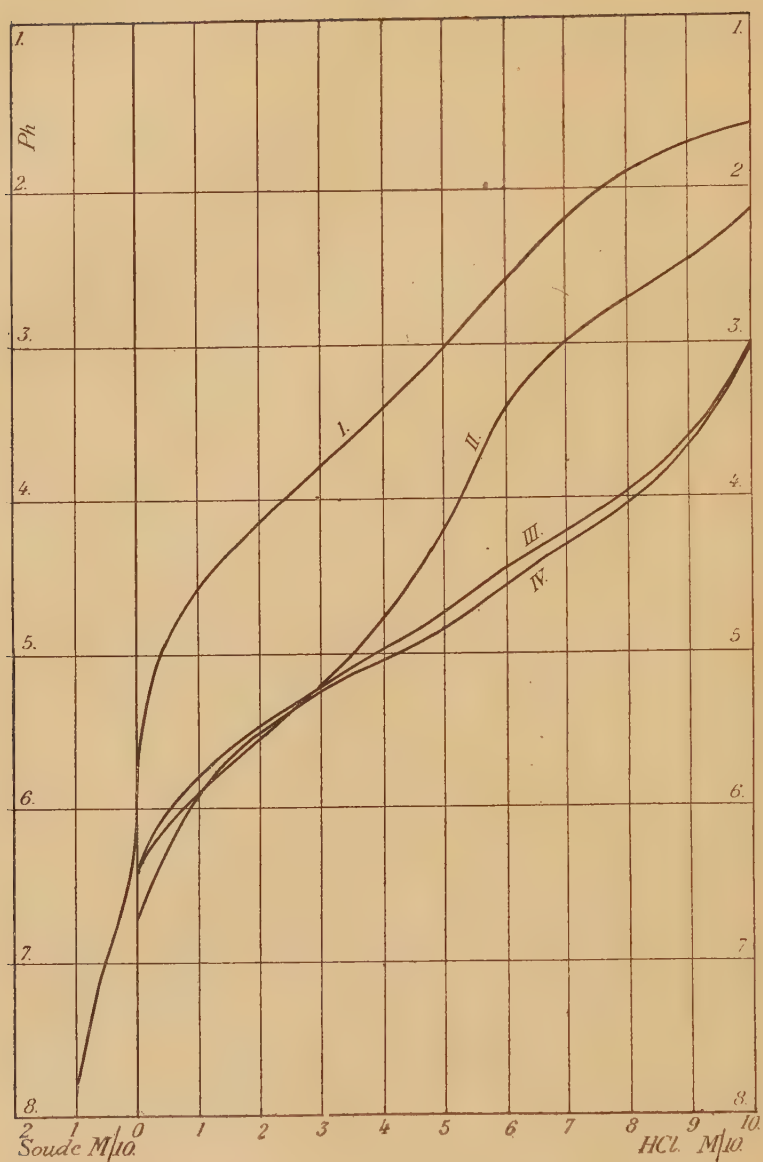


FIG. 8. — Courbe d'ajustage des sels ammoniacaux des acides de la série oxalique : 1, Oxalate d'ammoniaque ; 2, Malonate d'ammoniaque ; 3, Succinate d'ammoniaque ; 4, Glutarate d'ammoniaque.

$$(3) \quad q = \frac{1}{1 + \frac{k_1}{h} + \frac{k_1 k_2}{h^2}}$$

Si on calcule ces diverses expressions pour les valeurs successives de H , en fonction des constantes de dissociation données plus haut, on peut représenter les valeurs obtenues par des courbes que l'on construira en portant en abscisses l'échelle des ph et en ordonnées les valeurs de a_1 , a_2 et q . Ces courbes, que j'ai reproduites dans la figure IX, sont du même genre pour tous les acides bibasiques, seuls les paramètres diffèrent.

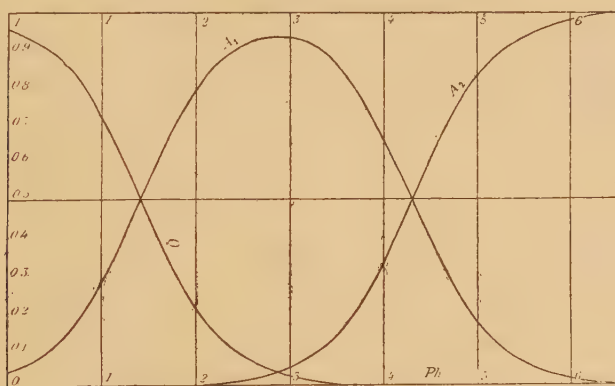


FIG. 9. — Courbe de dissociation de l'acide oxalique. — a_1 concentration de l'ion COOH-COO ; a_2 concentration de l'ion COO-COO ; q , concentration de la molécule non ionisée (reste de dissociation).

Le reste de dissociation, qui est presque égal à l'unité pour ph 1, tend vers 0 à ph 3,5 et au delà. Par conséquent, la concentration de la molécule non dissociée sera extrêmement faible, à partir de ph 3,5 et ne joue vraisemblablement aucun rôle dans le phénomène observé. La concentration du reste (COO-COO) que représente la courbe (a_2) est égale à l'unité pour ph 6 et décroît pour s'annuler pratiquement vers ph 2. Cela veut dire que les sels bibasiques en solution neutre sont totalement dissociés : comme dans ces conditions ils ne sont pas toxiques, on peut en déduire que l'action infertilisante observée n'est pas due à l'ion (COO-COO).

La courbe (a_1) indique les variations de concentration de l'ion (COOH-COO) (oxalate acide). Cet ion, presque absent dans les solutions neutres, voit sa concentration croître jusqu'à un maximum

voisin de ph 2,85. Dans les conditions où je me suis placé, c'est lui qui me paraît responsable de l'action infertilisante exercée par l'acide oxalique. La molécule entière doit être également toxique, mais son étude échappe à l'expérimentation, puisque dans la zone où son action pourrait s'exercer, elle se superposerait à l'action de l'ion H. Si cette opinion est exacte, elle doit être justiciable des mêmes méthodes qui m'ont servi à établir le mécanisme de l'action toxique des acides gras.

Pour le vérifier, j'ai préparé des milieux aux concentrations suivantes en oxalate : N/3,125, N/10, N/31,25, N/100. Le tableau 35 résume les expériences instituées dans cette direction. A la concentration N/3,125, la culture s'annule pour ph 4,6 (Récolte = 0.0005) et entre ph 3,6 et 3,2 pour la concentration N/10. Les résultats des deux dernières séries ne sont guère à retenir, car on arrive dans la zone où l'ion H exerce son action propre. La valeur de (a_1) à ces divers ph et les concentrations de l'ion (COO-COOH) que l'on peut en déduire aux diverses dilutions utilisées, sont les suivantes :

	ph	a_1	COO-COOH
N/3,125	4,6	0,338	0,108 M
	4,8	0,244	0,0708 M
N/10	3,2	0,926	0,0926 M
	3,4	0,893	0,0893 M

L'arrêt de la culture n'est pas brusque et il y a des intermédiaires qui rendent l'appréciation délicate. Les chiffres sont néanmoins assez concordants pour qu'on puisse tenir pour exact que la toxicité de l'acide oxalique à l'égard de l'*Aspergillus repens* est due à l'ion (COOH-COO), sans préjuger de l'action de la molécule entière.

TABLEAU 33

Oxalate d'ammoniaque.	0,62 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

	2,6	3	4	5	6	7	8	8,4
PH initial	2,6	3	3,9	3,8	3,8	3,8	3,8	4,05
PH final	2,6	3	3,9	3,8	3,8	3,8	3,8	4,05
Récolte	0	0	0,004	0,1225	0,1388	0,1456	0,1985	0,1635

TABLEAU 34

Oxalate d'ammoniaque.	0,62 %
Saccharose	5 %
PH initial	5,4

Age	PH	Récolte	Ammoniaq. résiduelle	Pouvoir tampon	Sucre résiduel
				(1)	
2	5,4				
4	4,7	0,0275			
6	4,3	0,0586		1,6/1,6	
8	4,1	0,0952	7,3	2/2,1	
10	3,9	0,1314	6,85	2,4/2,6	1 gr. 325
12	3,85	0,1615	6,25	2,4/2,8	0,830
14	3,85	0,1581	6,25		0,901
16	4,3	0,1768	6,5	2/1,9	0,509
18	4,3	0,1817	6,7	1,3/1,3	0,432
20	4,6	0,1895	6,7	1/1	0,350
30	4,6	0,2461	6,65	1/1	0,015

Les cultures sur le milieu ordinaire à *ph* initial 5,4 sont résumées dans le tableau 34. L'oxalate d'ammoniaque se montre un aliment passable, donnant une culture lente, grâce à quoi, le milieu n'étant pas épuisé, l'accroissement du mycélium se poursuit pendant longtemps : au 30^e jour, il atteint 0,246 et il reste encore des traces de sucre. Le *ph* passe par un minimum 3,85 au 14^e jour. A ce moment il reste encore une dose notable de sucre et le pouvoir tampon du milieu est intact. La régression du *ph* qui se manifeste à ce moment n'est pas facile à expliquer : elle ne semble pas due à la consommation de l'ion oxalique car, même au trentième jour, le pouvoir tampon du milieu est à peu près intact. La protéolyse intervient pour une part, comme l'indiquent les chiffres de l'ammoniaque résiduelle.

(1) Les valeurs données sous la rubrique : Pouvoir tampon, sont obtenues comme je l'ai expliqué, page 38. C'est le rapport des volumes de solutions acides ou alcalines titrées nécessaires pour produire une variation déterminée du *ph* sur le liquide de culture en expérience et sur le milieu initial. La détermination porte sur une région des *ph* où s'exerce l'action tampon du corps étudié. Ici l'expérience a été faite entre *ph* 6 du côté alcalin et le *ph* atteint par la culture.

TABLEAU 35

Oxalate d'ammoniaque. variable.
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

Concentration en oxalate	PH	PH	Concentration moléculaire de l'ion (COO-COOH)	Récolte	Observations
N/3,125	4,6	4,6	0,108	0	Pas de culture.
	4,8	4,6	0,0708	0,0140	Quelques îlots blancs.
	5	4,7	0,0540	0,0474	Voile blanc glaireux mince
	5,2	4,6	0,0364	0,0750	id.
	5,4	4,6	0,024	0,0930	Voile jaune au centre.
N/10	3,2	3,2	0,0926	0	Pas de culture.
	3,4	3,4	0,0893	0,005	Flocons glaireux, pas de cellules géantes.
	3,6	3,6	0,0833	0,0068	id.
	3,8	3,7	0,0764	0,0082	id.
	4	3,9	0,0666	0,0132	id.
N/31,25	4,2	4	0,0565	0,017	id.
	2,6	2,6	0,0294	0	Pas de culture.
	2,8	2,8	0,0297	0	id.
	3	3	0,0297	0	id.
	3,2	3,2	0,0294	0,0021	Flocons immergés formés de cellules géantes.
N/100	3,4	3,4	0,0285	0,013	id.
	2,6	2,6	0,0092	0,0036	Flocons formés de cellules géantes uniquement.
	2,8	2,8	0,0093	0,0018	id.
	3	3	0,0093	0,0185	id.
	3,2	3,2	0,0089	0,0401	id.
	3,4	3,4	0,0083	0,0305	id.

MALONATE D'AMMONIAQUE : $\text{COO NH}^4\text{-CH}_2\text{-COO NH}^4$ P.M.138.

$$K_1 = 1,5 \times 10^{-3}$$

$$\log. 1/K_1 = 2,824$$

$$K_2 = 2,1 \times 10^{-6}$$

$$\log. 1/K_2 = 5,678$$

Le malonate d'ammoniaque a été préparé extemporanément par mélange, volume à volume, de solutions normales d'acide malonique (produit Poulenc) et d'ammoniaque. J'ai vérifié que par addition

d'un demi-volume de HCl normal, le *ph* devenait égal à 4,25. C'est le point de demi-virage défini par la relation :

$$ph = \frac{1}{\sqrt{K_1 \times K_2}} = 4,251$$

MICHAELIS (*l. c.*, p. 51.)

Le milieu complet a pour *ph* 6,4. La zone tampon de la courbe de neutralisation va de *ph* 6,4 à *ph* 2 (Fig. 8-2).

L'essai préliminaire sur les milieux à *ph* étagés donne les résultats donnés au tableau 36.

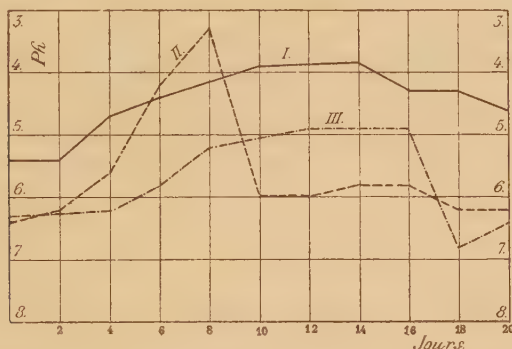


FIG. 10. — Variations du *ph* avec l'oxalate d'ammoniaque et ses homologues : 1, Oxalate d'ammoniaque ; 2, Malonate d'ammoniaque ; 3, Succinate d'ammoniaque.

Les très fortes récoltes obtenues montrent que le malonate d'ammoniaque est un excellent aliment. Il n'est pas impossible qu'à des concentrations plus fortes on puisse observer une action toxique. Je n'ai d'ailleurs pas fait d'expériences dans ce sens.

TABLEAU 36

Malonate d'ammoniaque	0,69 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours

PH initial	3,5	4	4,5	5	6	7	7,5	8
PH final	3,4	3,2	4	4,6	4	4,7	4,9	5,6
Récolte	0,020	0,169	0,259	0,330	0,509	0,431	0,430	0,175

L'aspect des cultures est très instructif. Sur les milieux plus acides que *ph* 6, on a un voile jaune d'or, riche en périthèces, avec de rares

conidiophores. Dans les milieux plus alcalins (*ph* 7, 7,5 ou 8), la culture débute par des îlots convertis d'un gazon conidien vert intense, puis au fur et à mesure que le milieu s'acidifie, les îlots se réunissent par une trame jaune, si bien que l'aspect final est un voile épais, jaune d'or, avec des îlots verts représentant le début de la culture. Un examen superficiel ferait croire à une culture impure.

TABLEAU 37

Malonate d'ammoniaque	0,69 %
Saccharose	5 %
PH initial	6,4

Age	PH	Récolte	Ammoniaq. résiduelle	Pouvoir tampon entre 6 et 4,2	Sucre résiduel
2	6,2				
4	5,6	0,028			
6	4,2	0,2440	5,5	4/4,2	
8	3,3	0,5476	0	1,8/4,2	0,017
10	6	0,380	2	0,6/4,3	0
12	6	0,4002	1,5	0,45/4,2	traces
14	5,8	0,392	1,4	»	
16	5,8	0,360	2,4	0,7/4,2	
18	6,2	0,3295	2,75	»	
20	6,2	0,3023	2,75	0,7/4,2	
30	7	0,3238	2,9	»	

La série habituelle des cultures est réunie dans le tableau 37. On remarquera la rapidité et l'intensité de la culture. Le maximum, atteint dès le huitième jour, est suivi d'une protéolyse intense avec ses manifestations habituelles. La consommation de la molécule malonique commence à peu près au moment où le sucre est entièrement utilisé ; elle est rapidement complète et a pour effet de ramener le milieu au *ph* primitif.

SUCCINATE D'AMMONIAQUE. $\text{COONH}^4\text{-CH}^2\text{-CH}^3\text{-COONH}^4$ -
P. M. 152.

$$K_1 = 6,6 \times 10^{-5} \quad K_2 = 2,7 \times 10^{-6}$$

$$\log. 1/K_1 = 4,18 \quad \log. 1/K_2 = 5,568$$

J'ai utilisé le sel ammoniacal cristallisé. Le milieu complet a pour *ph* 6,4. La courbe de neutralisation est beaucoup plus inclinée que

celle des deux acides précédents (Fig. 8-3), fait dû à ce que l'acide succinique est un acide plus faible et à ce que ses deux constantes de dissociation ne sont pas voisines. Les deux séries de cultures sont résumées dans les tableaux 38 et 39. La culture est un peu moins rapide que dans le cas du malonate et le maximum n'est atteint qu'au quatorzième jour.

TABLEAU 38

Succinate d'ammoniaque 0,76 %

Saccharose 5 %

Durée 10 jours

PH initial ...	2,6	3	4	5	6	7	8	8,4
PH final	2,6	3	2,8	4,6	5	5,1	5,4	5,3
Récoltes.....	0	0,0085	0,1935	0,2978	0,2291	0,2527	0,1285	0,1540

TABLEAU 39

Succinate d'ammoniaque 0,76 %

Saccharose 5 %

PH initial 10

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
4	6,2				
5	5,9				
6	5,8	0,060	9,7	4,5/4,5	
8	5,2	0,159	8,8	4,5/4,5	
10	5	0,331	7,2	4,5/4,5	
12	4,9	0,357	7	4,2/4,5	2,07
14	4,9	0,480	4,6	2,85/4,5	0,337
16	4,9	0,413	4,8	3,4/4,5	0,675
18	6,8	0,407	4,85	»	0,125
20	6,4	0,393	5,5	1/4,5	0,070
22	6,8	0,398	5	1/4,5	0,125

GLUTARATE D'AMMONIAQUE. $\text{COONH}^4\text{-CH}^2\text{-CH}^2\text{-CH}^2\text{-COONH}^4$.
P. M. 166.

$$\begin{aligned} K_1 &= 4,7 \times 10^{-5} & K_2 &= 2,9 \times 10^{-6} \\ \log. 1/K_1 &= 4,327 & \log. 1/K_2 &= 5,538 \end{aligned}$$

Le sel ammoniacal a été obtenu extemporanément à partir de

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 4,7.

l'acide glutarique. Le point de demi-virage, défini théoriquement par la relation $ph = \frac{1}{\sqrt{K_1 \times K_2}} = 4,95$, a été trouvé égal à 4,90.

Le *ph* initial du milieu complet est 6,7 (Fig. 8-4).

Le glutarate d'ammoniaque, par sa dissociation et sa valeur alimentaire, est très voisin de l'acide succinique. Les résultats donnés par ces deux corps sont tout à fait comparables.

TABLEAU 40

Glutarate d'ammoniaque 0,83 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

PH initial ...	3,2	3,4	3,6	4	4,5	5	6	7
PH final	2,7	2,6	2,4	3	4,4	5,1	4,7	4,8
Récoltes.....	0,106	0,147	0,220	0,281	0,342	0,405	0,513	0,518

TABLEAU 41

Glutarate d'ammoniaque 0,83 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 6,7

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
2	6,2				
3	6,1				
4	5,5	0,030	9,15	4,9/4,5	
6	5,4	0,085	8,5		
8	5,3	0,140	6,75	4,5/4,5	
10	5,2	0,198	7,4	4,7/4,5	
12	4,6	0,303	6,4		0,8275
14	5	0,322	4,8	3,6/4,5	0,758
16	5,2	0,300	5,35	3,45/4,5	0,458
18	6,4	0,320	5,2		0,120
20	6,4	0,175	5,2	3,6/4,5	néant

ADIPATE D'AMMONIAQUE. — $\text{COONH}^4\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-COONH}^4$ P. M. 180.

$$K_1 = 3,6 \times 10^{-5} \quad K_2 = 3,2 \times 10^{-6}$$

$$\log. 1/K_1 = 4,444 \quad \log. 1/K_2 = 5,49$$

L'adipate d'ammoniaque a été préparé extemporanément au

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 4,85.

laboratoire. Le *ph* initial du milieu complet est 6,4. Les constantes de dissociation de cet acide sont très voisines de celles de ses homologues inférieurs. Aussi la courbe de neutralisation, définie par les mêmes points, est-elle superposable aux précédentes. Les résultats sont résumés dans les tableaux 42 et 43. Les rendements sont du même ordre, avec une légère infériorité pour ce corps. Au dix-huitième jour, l'évolution de la culture n'était pas finie, il restait du sucre; la molécule acide était en partie attaquée.

TABLEAU 42

Adipate d'ammoniaque	0,90 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours

PH initial ...	2,6	2,8	3	4	5	6	7	8
PH final	2,6	2,8	3,3	3,4	4,5	5	4,8	5,2
Récoltes . . .	0	0	0,013	0,117	0,158	0,171	0,361	0,169

TABLEAU 43

Adipate d'ammoniaque.	0,90 %
Saccharose	5 %
PH initial	6,4

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
2	6				
4	5,7	0,0175	8,8		
6	5,3	0,0492	8,15		
8	5,2	0,0864	7,7	4,75/4,75	1,882
10	5,1	0,1316	7,5	4,75/4,75	1,562
12	5	0,1651	6,5	3,75/4,75	1,230
14	4,8	0,2652	5,65	3,5/4,75	0,587
16	4,75	0,2335	5,9	3,6/4,75	0,368
18	4,7	0,2325	5,8	3/4,75	0,100
20	6,1		6,35	0,6/4,75	néant

SUBÉRATE D'AMMONIAQUE.



P. M. 208.

$$K_1 = 2,99 \times 10^{-5}$$

$$K_2 = 2,1 \times 10^{-6}$$

$$\log 1/K_1 = 4,524$$

$$\log 1/K_2 = 5,678$$

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 3,9.

L'acide subérique est peu soluble et l'on ne peut préparer directement une solution normale. J'ai obtenu le sel ammoniacal en solution demi normale en dissolvant 8 gr. 70 d'acide cristallisé, séché à l'étuve, dans 10 cc. d'ammoniaque normale et en complétant à 200 cc. Le *ph* de cette solution est égal à 6,8. Par demi-neutralisation, on obtient 4.8 (calculé, d'après l'expression $ph = \frac{1}{\sqrt{K_1 \times K_2}} = 5,03$).

Ce corps donne des résultats du même ordre de grandeur que les précédents ; cependant, dans les cultures sur milieux à *ph* variés, je n'ai pas obtenu de culture pour *ph* 5 et au-dessous. Nous voyons donc apparaître ici une substance toxique. Le phénomène est susceptible, sans doute, de la même analyse que dans le cas de l'acide oxalique, mais je n'ai pas fait d'expériences en concentrations variables en acide subérique.

TABLEAU 44

Subérate d'ammoniaque 1,04 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours

PH initial	2,6	3	4	5	6	7	8
PH final	»	»	»	»	4,2	4,4	4,6
Récoltes	0	0	0	0	0,3840	0,4252	0,2825

Valeur comparée des divers acides bibasiques. — Nous pouvons maintenant comparer les divers acides de la série oxalique en mettant en regard les récoltes obtenues à divers âges de la culture.

Le tableau 46 nous fait d'abord ressortir la nécessité de suivre au jour le jour les cultures, sous peine d'avoir une idée très fausse de leur évolution. Certaines différences sont probablement dues à des inégalités inévitables dans des ensemencements faits à plusieurs semaines d'intervalle. C'est ainsi que l'acide adipique m'a donné, dans une autre série, 0,375, au 18^e jour. On peut admettre que, l'oxalate d'ammoniaque mis à part, ces corps sont d'excellents aliments et que le fait est dû à leur faible dissociation. Les résultats exceptionnels obtenus avec l'acide malonique s'expliquent peut-être par le fait que le champignon arrive plus facilement dans la région *ph* 4,5 *ph* 3, qui est la véritable zone optimum. Les autres cultures sont maintenues au-dessous de *ph* 5, dans une région qui ne conviendrait pas aussi bien au champignon. Enfin, sauf dans le cas de

TABLEAU 45

Subérate d'ammoniaque	1,04 %
Saccharose	5 %
PH initial	6,4

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)
4	5,8	0,0142		
6	4,9	0,1330	7,5	»
8	4,4	0,3200	1,9	4,15/4,5
10	4,5	0,4354	0,35	1,8/4,5
12	5,8	0,4372	2,3	0,9/4,5
16	6,2	0,2888	4,9	0,9/4,5
18	6,8	0,3140	4,5	0,55/4,5
20	6,6	0,2907	4,6	0,8/4,5
22	7,2	0,3045	4,4	»
24	7,2	0,2805	4,8	»

TABLEAU 46 (2)

	8 ^e jour		14 ^e jour		20 ^e jour	
	Récolte	PH	Récolte	PH	Récolte	PH
A. oxalique	0,0952	4,1	0,1581	3,85	0,1895	4,6
A. malonique	0,5476	3,3	0,392	5,8	0,3023	6,2
A. succinique	0,1590	5,2	0,480	4,9	0,393	6,1
A. glutarique	0,1400	5,3	0,322	5	0,175	6,4
A. adipique	0,0864	5,2	0,2652	4,8	0,2907	4,7
A. subérique	0,3200	4,4	0,4372	5,8	0,2907	6,6

l'acide oxalique, le champignon attaque la molécule acide. Cette attaque ne se produit guère que lorsque le sucre a presque entièrement disparu, celui-ci exerçant à l'égard de ces corps une sorte d'action protectrice. La consommation du reste acide est d'ailleurs d'autant plus rapide et complète que le mycélium préformé est plus abondant.

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 4,8.

(2) Voir fig. 10.

En ce qui concerne le *ph* minimum atteint, nous avons de très grandes différences entre les acides. Ce n'est pas le plus dissocié qui fournit le milieu le plus acide. Les cultures sur oxalate d'ammoniaque s'arrêtent à *ph* 3,8 environ, point qu'elles semblent ne pouvoir dépasser. Mais il suffit d'abaisser la concentration de l'oxalate pour obtenir un *ph* plus bas (voir tableau 35).

La dissociation de l'acide joue cependant un rôle important et, de ce chef, la culture sur succinate, par exemple, même en admettant la consommation intégrale de l'ammoniaque, ne pourrait dépasser *ph* 3,6. Mais c'est la dose de sucre, qui pour un acide déterminé, règle le *ph* atteint. Tant qu'il reste du sucre, la Mucédinée s'attaque peu ou pas à la molécule acide et le *ph* baisse régulièrement et proportionnellement à l'ammoniaque consommée. S'il y a beaucoup de sucre, le mycélium peut arriver à consommer tout l'azote offert et l'on a l'équivalent d'une solution N/10 en acide ; s'il y en a peu, la culture ne peut utiliser qu'une partie de l'azote offert et par suite le *ph* ne baisse que légèrement. C'est ce que montrent les cultures suivantes où le succinate d'ammoniaque a été utilisé en présence de doses croissantes de sucre.

TABLEAU 47

Succinate d'ammoniaque 0,76 %
 Saccharose 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 %
 PH initial 6,4

Age	SUCRE							
	2,5 %		5 %		10 %		20%	
	PH	Récolte	PH	Récolte	PH	Récolte	PH	Récolte
6 ^e jour. . .	5,6	0,0405	5,8	0,060	3,6	0,482	4,2	0,365
8 — . .	5,2	0,1508	5,2	0,159	3,9	0,6145	3,6	0,576
10 — . .	5,5	0,2153	4,9	0,357	4,2	0,6594	4,1	0,8505
22 — . .	8,2	0,1928	6,8	0,398	7	0,4985	4,1	1,019

Donc, suivant la dose de sucre, le *ph* minimum atteint est 5,2, 4,9, 3,6 et 3,6. On remarquera que la première culture s'est nettement alcalinisée. La dernière au contraire est restée dans la zone très acide ; elle renfermait d'ailleurs encore du sucre.

Les récoltes ont été obtenues avec la même dose d'ammoniaque. Le dosage de ce dernier corps montre que dans la dernière série l'azote ammoniacal a disparu dès le huitième jour. Cependant le mycélium continue à s'accroître et même double de poids. Cette formation de matière azotée ne peut se faire qu'aux dépens de cette forme intermédiaire de l'azote que j'ai déjà signalée, quand nous avons vu l'azote fixé par le mycélium ne représenter que 50 % de l'azote ammoniacal disparu.

CHAPITRE V

SELS AMMONIACAUX DES ACIDES ALCOOLS.

Les acides alcools sont des corps très importants au point de vue physiologique. Ils sont très répandus dans le règne végétal, soit comme produit d'élaboration de la cellule, soit comme produit des fermentations bactériennes ou fungiques. Leur parenté chimique avec les sucres d'un côté, avec les amino-acides de l'autre, leur fait jouer un rôle de premier plan dans les phénomènes de nutrition. Leur molécule est généralement assimilable comme celle des sucres ; ils ne sont pas toxiques, aussi leurs sels ammoniacaux se sont-ils toujours montrés de bons aliments pour les végétaux inférieurs, même les bactéries, qui sont généralement plus exigeantes que les champignons.

J'ai utilisé dans ce groupe :

L'acide lactique <i>d.</i> + <i>l.</i>	{	acides monobasiques.
» gluconique		
» malique <i>d.</i>	{	acides bibasiques.
» tartrique <i>d.</i>		
» mucique		
» citrique		acide tribasique.

Enfin l'acide fumarique, acide bibasique éthylénique, a été étudié à la suite de ce groupe.

LACTATE D'AMMONIAQUE. $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH-COONH}^4$ P. M. 106.

$$K_a \approx 1,38 \times 10^{-4} \quad \log. 1/K_a = 3,86$$

Le lactate d'ammoniaque cristallise mal et le produit commercial est un liquide sirupeux. J'ai préféré utiliser la solution obtenue extemporanément par mélange de solutions équimoléculaires. La solution d'acide officinal a été titrée suivant le procédé de la pharmacopée, en tenant compte de la présence de l'acide lactyl-lactique. La solution de lactate d'ammoniaque, préparée à froid d'après ces indications, a une réaction alcaline, mais en chauffant quelques minutes au bain-marie, en vase bouché, on obtient un produit dont le *ph* égale 5. Le *ph* initial du milieu complet égale 4,8.

L'acide lactique est un acide relativement fort (point de demi-virage 3,865) et la zone de *ph* 5 à *ph* 6 est mal stabilisée (Fig. 11-1).

L'essai préliminaire (Tableau 47) montre que l'ion lactique n'est pas sensiblement toxique pour l'*A. repens*, dans ces conditions de concentration. BOAS et LEBERLE (22), en ajustant deux milieux de

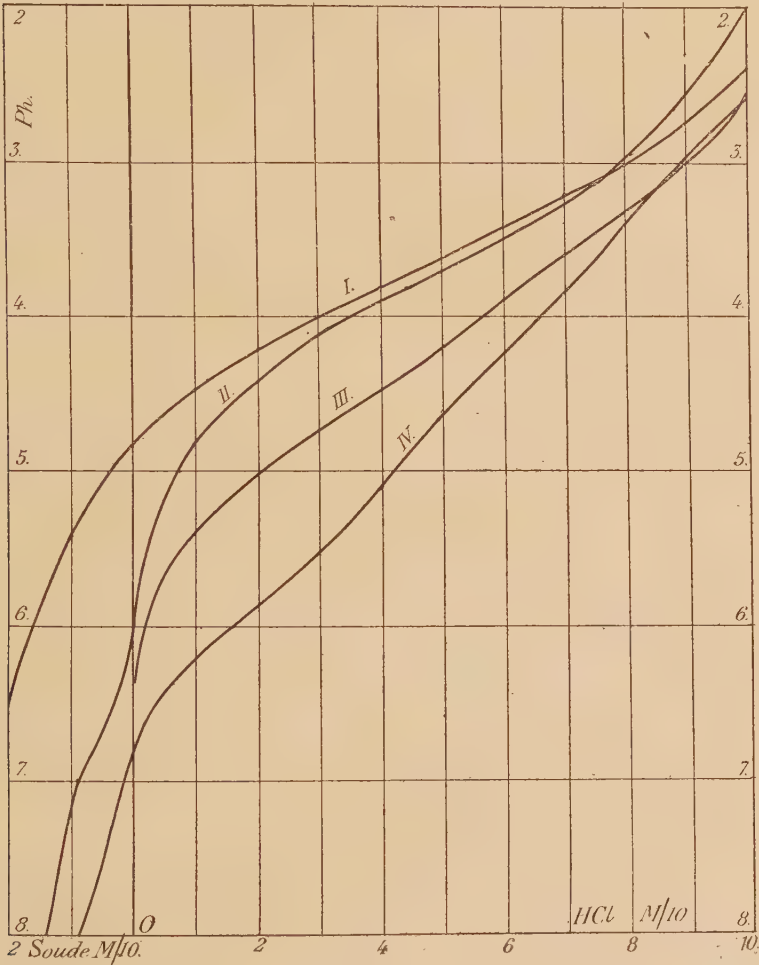


FIG. 11. — Courbe d'ajustage des milieux aux sels ammoniacaux d'acides alcools : 1, Lactate d'ammoniaque ; 2, Tartrate d'ammoniaque ; 3, Malate d'ammoniaque ; 4, Citrate d'ammoniaque.

culture, l'un avec l'acide sulfurique, l'autre avec l'acide lactique, ont trouvé que le deuxième milieu ne permettait pas la culture de *Mycoderma aceti*. Mais s'ils ont donné le *ph*, ils n'ont pas indiqué

les conditions exactes de concentration dans lesquelles ils se sont placés.

TABLEAU 47

Lactate d'ammoniaque. 1,06 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

PH initial.....	2,8	3,2	3,4	3,6	4	5	6	7	8
PH final	"	3,1	2,9	2,3	4,2	4,9	4,5	4,8	8
Récoltes		0,017	0,290	0,430	0,473	0,476	0,405	0,240	0,010

TABLEAU 48

Lactate d'ammoniaque. 1,06 %
 Saccharose 5 %
 PH. 4,8

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle(1)	Pouvoir tampon (2)	Sucre résiduel
2	4,6	0,0075	9,3	5/5	
4	4,4	0,1066	7,6	5/5	
6	4,3	0,2750	4,9	4,4/5	1,20
8	4,8	0,4962	5,4	2,4/5	0,31
10	6,3	0,4170	3,9	1,6/5	traces
12	6,6	0,3449	4,2	1/5	traces
14	6,4	0,4295	3,8		
16	6,2	0,3166	4,7		
18	6,4	0,3446	4,2		
20	6,4	0,3425	3,6		
30	6,8	0,3090	4,5		

GLUCONATE D'AMMONIAQUE. $\text{CH}^2\text{OH}-(\text{CHOH})^4-\text{COONH}^4$
 P. M. 213.

Je n'ai pas trouvé, dans la littérature scientifique, d'indications sur la constante de dissociation de l'acide gluconique. D'après la courbe de neutralisation du produit que j'ai eu entre les mains, c'est

(1) Ammoniaque initiale 9,5.

(2) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 4,8 et *ph* 3,6.

un acide relativement bien dissocié, dont le point de demi-virage se

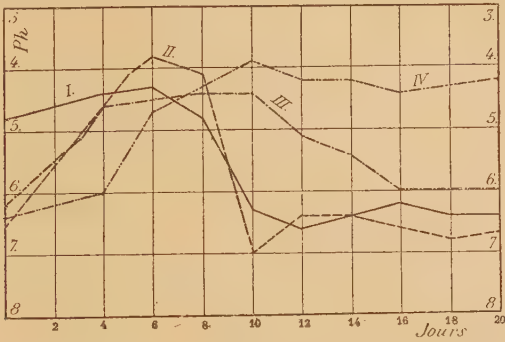


FIG. 12. — Variations du pH sur milieux aux sels ammoniacaux des acides alcools : 1, Lactate d'ammoniaque ; 2, Gluconate d'ammoniaque ; 3, Tartrate d'ammoniaque ; 4, Mucate d'ammoniaque.

trouve vers pH 3,4, ce qui en ferait un acide plus fort que l'acide

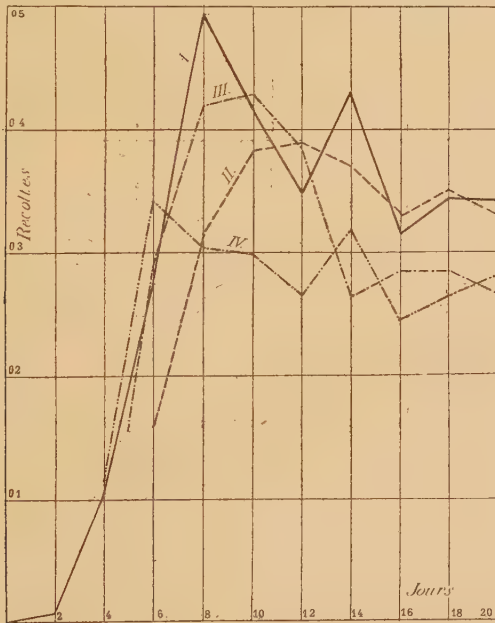


FIG. 13. — Courbes de croissance sur les ammoniacaux des acides alcools : 1, Lactate d'ammoniaque ; 2, Tartrate d'ammoniaque ; 3, Gluconate d'ammoniaque ; 4, Malate d'ammoniaque.

lactique. Le sel ammoniacal a été préparé au laboratoire à la façon

ordinaire. Ce corps permet une culture rapide accompagnée de la consommation de la molécule acide.

TABLEAU 49

Gluconate d'ammoniaque. . . . 2,13 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

PH initial . . .	2,8	3	4	5	6	7	8
PH final . . .	2,8	2,6	3,6	5	6,8	6,4	3,9
Récoltes . . .	0,066	0,232	0,427	0,503	0,447	0,544	0,554

TABLEAU 50.

Gluconate d'ammoniaque. . . . 2,13 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 6,5

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
3	5				
5	4,1	0,155		4,8/5	
6	3,8	0,286	4,2	4,8/5	
8	4,1	0,419	3,1	2,1/5	0,533
10	7	0,427	2,6	1,8/5	traces
12	6,4	0,388	3,2	1,8/5	id.
14	6,4	0,265	3,25	1,3/5	id.
16	6,6	0,285	3,15		
18	6,8	0,285	3,2		
20	6,7	0,269	3	1,6/5	

MALATE D'AMMONIAQUE. $\text{COONH}^4\text{-CH}^2\text{-CHOH-COONH}^4$
 P. M. 168.

$$\begin{aligned} K_1 &= 3,99 \times 10^{-4} & K_2 &= 7,8 \times 10^{-6} \\ \log. 1/K_1 &= 3,399 & \log. 1/K_2 &= 5,108 \end{aligned}$$

Le sel ammoniacal a été préparé extemporanément au laboratoire, suivant le mode habituel. Le malate d'ammoniaque donne une culture très rapide qui s'alcalinise dès le dixième jour, par suite de la consommation précoce de l'acide malique. Cette circonstance a pour

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 3,4.

effet d'amener le champignon dans une zone peu favorable (*ph* 6 à *ph* 7), bien avant la consommation intégrale du sucre. Cela se traduit par l'arrêt presque complet du développement, si bien que l'on arrive à cette conclusion paradoxale que la valeur alimentaire d'un corps peut nuire à son utilisation.

TABLEAU 51

Malate d'ammoniaque	0,84 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

PH initial	2,6	2,8	3	3,6	4	5
PH final	2,6	2,8	2,9	3	4	4,6
Récoltes	0	0,002	0,003	0,184	0,230	0,240

TABLEAU 52

Malate d'ammoniaque	0,84 %
Saccharose	5 %
PH initial.	6,2

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
2	5,6				
3	5,3				
4	4,8	0,106			
6	4,3	0,3401	3,4	3,2/4,8	1,09
8	4,7	0,3016	3,8	3/4,8	0,9425
10	6,2	0,2998	3,4	1/4,8	0,307
12	6,4	0,2650	3,6	1,4/4,8	0,307
14	6,4	0,3195	3,75	1,1/4,8	traces
16	6,5	0,2464	3,70		
18	6,8	0,2650	4,2	0,7/4,8	
20	6,8	0,2802	4,4	0,7/4,8	
32	8,2	0,2354	4,8	0,5/4,5	

TARTRATE D'AMMONIAQUE. — $\text{COONH}^4\text{-CHOH-CHOH-COONH}^4$.
P. M. 184.

$$\begin{array}{ll} K_1 = 9,7 \times 10^{-4} & K_2 = 4,5 \times 10^{-5} \\ \log. 1/K_1 = 3,013 & \log. 1/K_2 = 4,347 \end{array}$$

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 4,2.

J'ai utilisé le sel ammoniacal neutre cristallisé, dont la solution a pour *ph* 6,2. Le point de demi-virage théorique est 3,68 (trouvé 3,6) (Fig. 11-2). Le milieu initial a pour *ph* 6. Le tartrate d'ammoniaque donne à peu près les mêmes résultats que le malate avec une courbe de croissance de même allure. Cependant la consommation de l'acide tartrique est moins précoce, ce qui a permis une culture légèrement supérieure (Fig. 12 et 13).

TABLEAU 53

Tartrate d'ammoniaque 0,92 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

PH initial ...	3,4	3,6	4	6	7	8	8,2
PH final	3,2	3,2	3,4	4,4	4,6	4,5	4,8
Récoltes	0,004	0,098	0,100	0,381	0,452	0,220	0,212

TABLEAU 54

Tartrate d'ammoniaque 0,92 %
 Saccharose 5 %
 PH. 6

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
3	5,1				
4	4,6				
6	4,5	0,160	6,8	5/5	1,95
8	4,4	0,315	5,2	3/5	»
10	4,4	0,381	4,2	1,5/5	0,480
12	5,1	0,388	5,05	»	0,205
14	5,4	0,370	5	1,6/5	0,2625
16	6	0,331	5	»	traces
18	6	0,351	4,8	1,5/5	
20	6	0,331		1,5/5	
22	6	0,300	4,75		

MUCATE D'AMMONIAQUE. — $\text{COONH}^4\text{-(CHOH)}^4\text{-COONH}^4$.
 P. M. 244.

$$K_1 = 6,3 \times 10^{-4} \quad \log. 1/K_1 = 3,194$$

Le sel ammoniacal a été préparé extemporanément au laboratoire.

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 3,7.

Vu la faible solubilité de l'acide mucique, j'ai dissous 13 gr. 50 d'acide dans 100 c. c. d'ammoniaque N/1. En complétant à 200 c. c., on a une solution N/2 de mucate d'ammoniaque, de $ph = 6,4$. On remarquera ici la consommation tardive et peu considérable de la molécule acide, même après la consommation totale du sucre. Il en résulte que le milieu reste dans la zone acide et qu'il n'y a pas régression du ph . La protéolyse est également peu considérable, par suite du maintien d'une réaction défavorable aux ferments protéolytiques. Ces faits sont à rapprocher de ceux que nous a fournis l'acide oxalique (Fig. 12).

TABLEAU 55

Mucate d'ammoniaque. 1,22 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

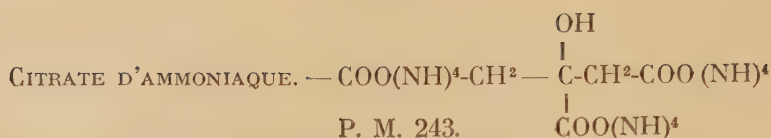
	2,8	3	4	5	6	7	8
PH initial ...	2,8	3	4	5	6	7	8
PH final	2,8	2,8	3,6	4	4	4	4,4
Récoltes	0	0,005	0,187	0,330	0,335	0,342	0,187

TABLEAU 56

Mucate d'ammoniaque. 1,22 %
 Saccharose 5 %
 PH initial. 6,4

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
4	6				
5	5,4				
6	4,7	0,050	8,95	4,8/4,8	
8	4,3	0,160	7,6	4,8/4,8	
10	3,9	0,338	6,05	3,8/4,8	0,654
12	4,2	0,262	7	3,3/4,8	
14	4,2	0,295	6,9	3,3/4,8	0,025
15	4,4	0,265	7	4/4,8	
18	4,3	0,347	6,8	4/4,8	
20	4,2	0,327	7,3		

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre ph 6 et ph 3,8.



$$\begin{array}{lll} K_1 = 8,2 \times 10^{-4} & K^2 = 3,2 \times 10^{-5} & K^3 = 7 \times 10^{-7} \\ \log_1/K_1 = 3,085 & \log^1/K^2 = 4,495 & \log^1/K^3 = 6,155 \end{array}$$

Par ses trois fonctions acides, l'acide citrique stabilise une région de l'échelle des *ph* plus étendue que les acides bibasiques. Si l'on y joint l'action tampon de l'ammoniaque, on trouve que le citrate triammonique stabilise toute la région de *ph* 10 à *ph* 3.6 (Fig. 11-4). Ce sel cristallise mal et le produit commercial n'est pas exactement défini. Au cours de l'évaporation de ses solutions, il se produit des pertes en ammoniaque par suite de l'hydrolyse du sel. La solution obtenue par mélange de solutions équimoléculaires a pour *ph* 7.4 (EASTMAN et HILDEBRANDT, 54). C'est la seule façon d'obtenir le citrate neutre. C'est celle que j'ai utilisée. Le milieu complet a pour *ph* 6,8. Jusqu'au huitième jour, le pouvoir tampon du milieu est intact et les chiffres de l'ammoniaque consommée correspondent à l'acidité de titrage. La consommation de l'acide citrique débute ensuite et arrive à être presque totale. Elle s'accompagne, comme d'habitude, d'un renversement de la réaction, puis d'une alcalinisation, enfin d'une protéolyse intense. On remarquera le début assez lent de la culture, dû à ce que le milieu initial a un *ph* voisin de 7 et à ce que la zone dysgénésique de 7 à 6, étant fortement stabilisée, est longue à franchir (Tableaux 57 et 58).

TABLEAU 57

Citrate d'ammoniaque	0,81 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

PH initial .	2,5	2,8	3	4	5	6	7	8	8,4
PH final ..	?	2,8	3	2,5	4,8	3,6	4,4	4,3	4
Récolte ...	0	0,0070	0,0336	0,3102	0,3341	0,3185	0,3482	0,352	0,3515

TABLEAU 58

Citrate d'ammoniaque	0,81 %
Saccharose	5 %
PH.	6,8

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
4	6,2				
5	5,8				
6	5,6	0,103	7,9	3/2,9	»
8	4,5	0,320	5	5,2/5,25	»
10	4	0,475	3	5,1/6,5	0,112
12	5	0,485	3,75	2,3/5	traces
14	6,6	0,411	3,85	1,6/4,4	0
16	6,5	0,363	2,8	0,8/5	»
18	6,6	0,345	3	»	»
20	6,9	0,410	4,35	»	»
22	6,8	0,325	3,25	»	»

FUMARATE D'AMMONIAQUE. — $\text{COONH}^4\text{-CH}=\text{CH-COONH}^4$
P. M. 150.

$$\begin{aligned} K_1 &= 9,4 \times 10^{-4} & K_2 &= 3,2 \times 10^{-5} \\ \log {}^1/K_1 &= 3,026 & \log {}^1/K_2 &= 4,495 \end{aligned}$$

Le fumarate d'ammoniaque a été préparé extemporanément au laboratoire à partir de l'acide libre. Celui-ci est sensiblement plus dissocié que les corps que nous venons d'étudier, aussi la zone de *ph* 6 à *ph* 5 est-elle mal stabilisée. Le *ph* initial du milieu est égal à *ph* 5,6, avec point de demi-virage pour *ph* 3,7. Le fumarate d'ammoniaque est d'ailleurs un excellent aliment qui se comporte sensiblement comme les corps précédents (Tableaux 59 et 60).

CONCLUSIONS. — On peut résumer ainsi la marche de la culture sur les sels d'acides alcools. Le développement est rapide et le milieu s'acidifie par la mise en liberté de l'acide du sel ammoniacal. La variation du *ph* est d'ailleurs amortie par le pouvoir tampon de ces

TABLEAU 59

Fumarate d'ammoniaque. . . . 0,75 %
Saccharose 5 %
Durée 10 jours.

PH initial	2,6	2,8	3	4	5	6	7	8
PH final	2,6	2,8	3,4	4,8	5,6	4,6	4,8	4,2
Récolte	0	0,010	0,242	0,295	0,482	0,295	0,200	0,305

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 7 et *ph* 4,5.

TABLEAU 60

Fumarate d'ammoniaque. 0,75 %
 Saccharose 5 %
 PH. 5,6

Age	PH	Récolte	Ammoniaque résiduelle	Pouvoir tampon (1)	Sucre résiduel
2	5,6				
3	5,3				
4	5	0,024	9,8	4,85/5	
6	4,1	0,177	6,5	4,9/5	
8	4,15	0,356	5	3,2/5	1,164
10	5,2	0,416	4,7	3,2/5	0,40
12	7	0,339	5	3/5	traces
16	7,2	0,311	5,35	2,3/4	
20	6,7	0,265	5,8	2,35/5	

acides. Jusqu'au 8^e ou 9^e jour, la variation est proportionnelle à l'ammoniaque consommée, car la molécule acide n'est pas fermentée. Mais son attaque ne tarde pas à se produire, plus ou moins intense, et il y a des différences très nettes entre l'acide mucique, qui n'est que très mal attaqué, et les autres corps de ce groupe. La consommation de l'acide entraîne des modifications profondes dans le milieu: la réaction revient vers la neutralité et le pouvoir tampon disparaît. D'autre part, le champignon, ramené dans une zone favorable à l'action des ferments protéolytiques, au moment où les hydrates de carbone ont disparu, subit une dégénérescence qui se traduit rapidement par une perte de poids atteignant jusqu'au tiers de la masse du mycélium et une augmentation de l'ammoniaque présente dans le liquide de culture.

Lorsque la molécule acide n'est pas susceptible d'être attaquée, le liquide reste acide, le pouvoir tampon ne subit pas de diminution et la protéolyse ne se déclare pas, ou ne présente qu'une intensité négligeable. Les différences présentées à ce point de vue par l'acide gluconique et l'acide mucique sont remarquables. Elles correspondent à une différence de structure stéréochimique. L'acide gluconique est le premier produit de l'attaque du glucose *in vitro* et aussi *in vivo*. MOLLIARD (118) a pu, en diminuant fortement la dose de

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 5,6 et *ph* 3,7.

l'azote et des sels minéraux, provoquer l'accumulation de cet acide dans les cultures de *Sterigmatocystis nigra*. L'acide mucique appartient à un groupe différent : c'est un produit direct de l'oxydation du galactose dont il possède la structure et son inaptitude à servir d'aliment carboné à l'*A. repens* doit être partagée par le galactose.

CZAPEK (45) attribue la grande valeur alimentaire des sels ammoniacaux de ce groupe à leur aptitude à servir d'aliment carboné. Ce fait peut avoir de l'importance lorsque la dose de sucre est insuffisante, comme c'était le cas dans les expériences de CZAPEK, ou lorsque leur poids moléculaire très élevé en fait utiliser une quantité notable (cas de l'acide gluconique). Mais, dans un milieu suffisamment riche en sucre, ce fait n'a plus qu'une importance secondaire. Il peut même être nuisible au rendement et nous avons vu, avec l'acide malique, que l'attaque précoce de la molécule acide, en ramenant le milieu dans une zone des *ph* peu favorable au développement, aboutit en fin de compte à une diminution de la récolte.

TROISIÈME PARTIE

ASSIMILATION DE L'ION NITRIQUE

Les moisissures peuvent, pour la plupart, assimiler l'ion nitrique des nitrates et même de l'acide nitrique libre. L'*Aspergillus glaucus* DE BARY, espèce très voisine de l'*A. repens*, a fait l'objet de nombreux travaux à ce sujet, à la suite de l'observation initiale de LAURENT (94). Cet auteur avait obtenu de meilleures récoltes avec les nitrates alcalins qu'avec le sulfate d'ammoniaque. J'ai rappelé comment RITTER (143) avait infirmé les conclusions de LAURENT. Ce même auteur, en 1914 (146), a constaté que l'acide nitrique libre est un excellent aliment, supérieur même au tartrate d'ammoniaque et aux nitrates, car son utilisation ne s'accompagne pas de la production d'acide oxalique aux dépens d'une partie du sucre.

On admet généralement, depuis SCHLÆSING et MUNTZ 1878 (152), que les nitrates au cours de leur assimilation sont d'abord réduits en nitrites, puis en ammoniaque. A l'appui de cette thèse qui nécessite un remaniement de la molécule absorbant de l'énergie, PURIEWITSCH (133) a montré que l'assimilation des nitrates s'accompagne d'une perte d'énergie considérable. Cette perte d'énergie, représentée conventionnellement par le rapport du gaz carbonique dégagé au poids de mycélium formé, est ici beaucoup plus élevée que pour les amino-acides, mais pas beaucoup plus que pour le sulfate d'ammoniaque. Ce dernier exemple est d'ailleurs mal choisi, à cause de l'acidification trop considérable du milieu, qui fait vivre le champignon dans une zone dysgénésique et suffit, comme nous verrons, à infirmer les théories de CZAPEK et de PURIEWITSCH.

Plus suggestives sont les expériences de RACIBORSKI (135), qui a trouvé que l'addition d'un oxydant (ClO^3K) arrêta l'assimilation des nitrates, alors que la présence d'un réducteur la favorisait.

La preuve directe de la formation intermédiaire des nitrites et de l'ammoniaque est assez difficile à administrer, ces corps ne se formant qu'à titre transitoire et leur caractérisation étant entourée de certaines difficultés. On sait ainsi que les nitrites sont toxiques en milieu acide et très instables. En fait, dans les milieux habituels que la culture maintient acides, on n'a jamais caractérisé les nitrites. Mais

si l'on s'adresse à des espèces alcalinisantes, ou si, comme l'a fait RITTER (144), on maintient le milieu neutre ou alcalin par divers artifices (addition de craie, réduction de la dose de sucre, ou son remplacement par des sels d'acides organiques), on peut alors faire vivre l'*Aspergillus niger* et l'*Aspergillus glaucus* aux dépens des nitrites, et d'autre part, caractériser les nitrites sur les milieux nitrates.

La mise en évidence de l'ammoniaque est plus facile, au point de vue technique, et a été faite par de nombreux auteurs (Kossowicz) (89), mais comme l'on sait depuis MALFITANO (107) que la protéolyse fait apparaître très rapidement de l'ammoniaque issue des processus de désassimilation, KOSTYTCHOW et TSWETKOWA 1920 (90) ont pu montrer que tous les résultats antérieurs étaient entachés de cette cause d'erreur. Ils ont réussi à caractériser le stade ammoniacal avec certitude par la méthode des cultures substituées. L'ammoniaque apparaît de bonne heure, dès la sixième heure, mais disparaît non moins vite, puisqu'on ne peut plus la caractériser au bout de 24 heures.

L'assimilation de l'ion nitrique aura ainsi une action indirecte sur le *ph* : la base, qui lui était unie dans le nitrate employé, s'accumule dans le milieu dont elle provoque l'alcalinisation. Elle passe d'ailleurs à l'état de carbonate ou de bicarbonate alcalin, sous l'influence du gaz carbonique, comme on peut le reconnaître par l'action de BaCl_2 . L'assimilation des nitrates alcalins aboutit donc, par une réaction secondaire, à une accumulation d'ions OH . Mais ce phénomène peut être masqué, en totalité, ou en partie, par la production d'acides organiques au cours de la combustion incomplète du sucre. Il y a, à ce sujet, de grandes différences entre les moisissures. Les unes, comme l'*A. niger*, produisent dans ces conditions de grandes quantités d'acide oxalique et la réaction finale est très acide (WEHMER 1891, 173). C'est ce que MOLLIARD (121) appelle l'acide oxalique de neutralisation. Les autres, comme le *Cladosporium herbarum* et le *Mucor racemosus* (RITTER 143), n'en fournissent pas et les cultures deviennent alcalines. L'*Aspergillus glaucus* DE BARY occupe une position intermédiaire, mais RITTER n'a pas caractérisé l'acide oxalique dans ses cultures.

J'ai utilisé, comme type de nitrates, le nitrate de potasse et le nitrate d'ammoniaque qui, par sa constitution, mérite une étude spéciale.

NITRATE DE POTASSE. — NO^3K P. M. 101.

Les milieux au nitrate de potasse, renfermant 1 gr. 01 pour 100 de

sel, ont d'abord servi à des essais préliminaires à des *ph* variés de *ph* 2,6 à *ph* 8,4 (Tableau 61).

TABLEAU 61

Nitrate de potassium 1,01 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

PH init.	2,6	2,8	3	3,6	4	5	6	7	8	8,4
PH final.	2,6	5,8	5,4	5,4	5,4	5,2	5,4	5,8	6,3	7,4
Récolte	0,	0,0834	0,1636	0,1398	0,1094	0,0935	0,0575	0,0520	0,0470	?

La limite acide est donc comprise entre 2,6 et 8,4. Les cultures sur milieux acides se sont alcalinisées, comme on peut s'y attendre. Elles sont formées d'un voile jaune d'or, avec de nombreux péri-thèces à tous les stades et de rares conidiophores. Les autres cultures se sont au contraire acidifiées ; elles sont d'ailleurs en retard sur les précédentes, car le champignon sort difficilement de la zone dysgénésique alcaline. Le voile est formé d'îlots dont le centre, correspondant aux parties organisées en milieu alcalin, est couvert de nombreux conidiophores et se trouve bordé d'une frange jaune organisée en milieu acide. J'ai déjà signalé de nombreux cas analogues.

L'expérience répétée plusieurs fois, à deux ans d'intervalle, a toujours donné les mêmes résultats. Les milieux nitrates sont d'autant plus favorables qu'ils sont plus acides ; le champignon amène dans tous les cas la réaction à une valeur moyenne intermédiaire. L'utilisation de l'azote aboutit pourtant dans tous les cas à la mise en liberté de KOH, c'est-à-dire à la diminution de la concentration des ions H. Il faut donc qu'en milieu neutre ou alcalin, il se produise un ou des corps acides, en quantité égale ou supérieure à celle de la potasse. L'acide carbonique joue dans ces phénomènes de neutralisation un certain rôle, en transformant l'alcali en carbonate alcalin moins dissocié. Mais ce rôle n'est effectif, comme SIERAKOWSKI (157) l'a montré, que si les cultures sont faites en vases scellés. Dans les récipients largement exposés à l'air, par suite de la tension de dissociation des bicarbonates alcalins, à la température de l'étuve, la majeure partie de CO² s'échappe.

Ces phénomènes sont donc sous la dépendance d'acides fixes, comme il s'en produit dans la dégradation du sucre. Parmi eux, il est naturel de penser d'abord à l'acide oxalique, connu depuis long-

temps comme un des produits du métabolisme des champignons inférieurs (WEHMER 173).

On connaît aujourd'hui avec assez de précision les conditions qui

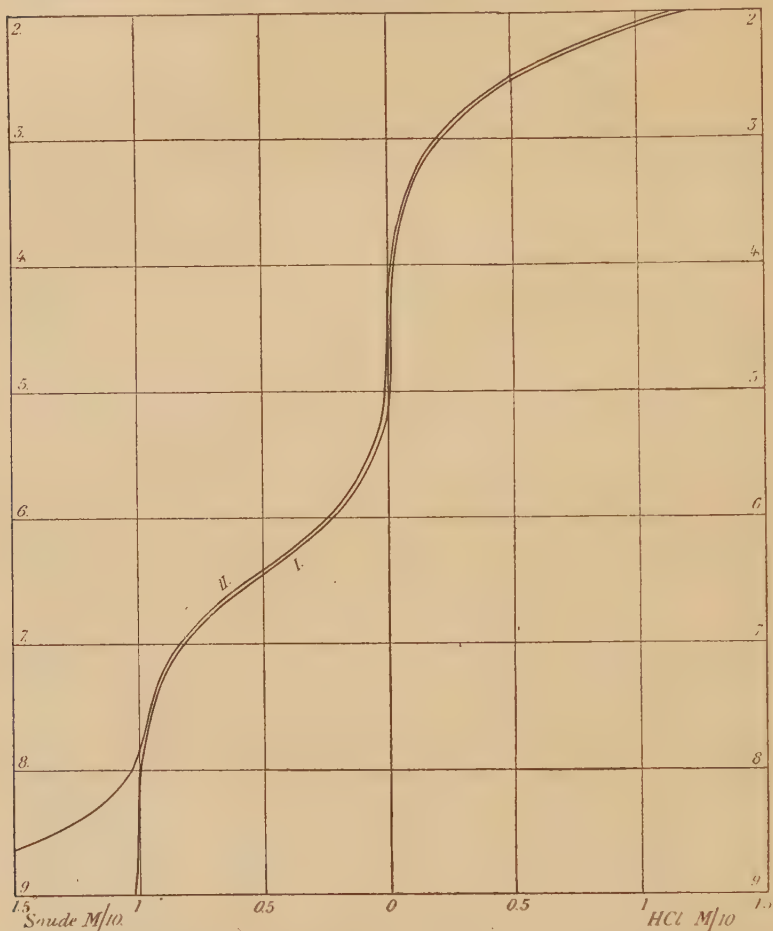


FIG. 14. — Courbe d'ajustage des milieux nitrates : 1, Nitrate de potassium ; 2, Nitrate d'ammoniaque.

président à la formation de cet acide, dans les cultures de *Sterigmatocystis nigra*. D'après MOLLIARD (121), on doit distinguer :

1° L'acide oxalique de neutralisation, qui se produit toutes les fois que la plante a à lutter contre des phénomènes d'alcalinisation, soit au cours de l'autolyse, soit au cours de l'assimilation des ni-

trates, de l'urée, des amino-acides, de la peptone, de l'albumine, etc. Sur peptone, par exemple, il s'en produit d'autant plus que le milieu renferme moins de sucre, car la peptone utilisée comme source de carbone laisse une grande quantité d'ammoniaque résiduelle qu'il faut neutraliser. Dans ces cultures, l'acide oxalique n'existe pas à l'état libre, mais sous forme de sel alcalin, généralement de sel ammoniacal.

2° *L'acide oxalique de fermentation*, se produisant dans les milieux déséquilibrés, où la teneur en phosphore, en potassium ou en soufre a été réduite à 1/25 de la dose optima. Ici, c'est de l'acide libre qui



FIG. 15. — Convergence du *ph* au cours de la culture sur milieux nitrés : 1, *Ph* initial 3,6 ; 2, *Ph* initial 5 ; 3, *Ph* initial 8.

se forme ; il peut atteindre un taux très élevé, puis disparaît en grande partie.

L'acide oxalique apparaît ainsi comme un des facteurs utilisés par la plante pour lutter contre les diverses causes d'alcalinisation. D'autre part, sa formation aux dépens d'un hexose implique une combustion incomplète, suivant le schéma :



sans dégagement de gaz carbonique, ce qui se traduit par un abaissement du quotient respiratoire. Les expériences de MOLLIARD ont montré que la formation d'acide oxalique et l'abaissement du quotient respiratoire sont précisément deux phénomènes liés entre eux et d'autant plus intenses que le liquide de culture est plus alcalin.

C'est en définitive la réaction du milieu, c'est-à-dire le *ph*, qui règle la production d'acide oxalique. Mais jusqu'ici on n'a pas fait d'expériences en se servant de cette notation de l'acidité. J'ai montré le premier que l'*Aspergillus repens* peut produire de petites quantités d'acide oxalique, mais, à ce point de vue, ce n'est pas un bon matériel d'étude, à cause des trop faibles quantités mises en œuvre. Aussi des expériences de cette nature auraient intérêt à être reprises avec le *St. nigra*.

Ces variations du *ph* en sens inverse étant un phénomène des plus remarquables, je les ai suivies sur trois séries de milieux, identiques entre eux, sauf en ce qui concerne la réaction initiale, qui était, suivant les cas, *ph* 3,6, *ph* 5 et *ph* 8. Les résultats sont résumés dans le tableau 62 (Fig. 15).

TABLEAU 62

Nitrate de potasse. 1,01 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 3,6 5 8

Age	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
PH	3,6	5,4	6	6,2	6	5,3	5,2	5	4,9	5,1	4,8	
Réc.			0,040	0,070	0,135	0,1535	0,165	0,242	0,218	0,234		
PH	5	5,2	5,8	5,7	5,8	5,5	5,4	5,2	5,5	5,6	6,8	
Réc.			0,0055	0,0095	0,0175	0,0632	0,1089	0,128	0,2325	0,1941	0,2084	
PH	8	7,8	7,3	7,1	6,8	6,7	6,4	4,3	»	4,9	6,9	7
Réc.				0,003	0,0125	0,0292	0,047	0,076		0,1692	0,1660	0,1548

L'évolution de ces cultures peut se résumer ainsi : les milieux acides voient d'abord la concentration des ions H s'abaisser rapidement jusqu'à *ph* 6, par suite de la mise en liberté de KOH. Cette alcalinisation, conséquence d'une active formation de mycélium, ne peut pas être contrebalancée au début par la production d'acides organiques respiratoires : la quantité de mycélium qui respire est en effet encore trop faible. Mais quand ce poids de mycélium est devenu assez considérable et que la réaction a atteint un niveau où la formation d'acide oxalique est favorisée, les causes d'acidification l'emportent sur les causes d'alcalinisation : la réaction se renverse et le *ph* remonte lentement, jusqu'à *ph* 5 environ. Ce point n'est guère dépassé, bien qu'à ce moment la formation de mycélium,

par suite de l'épuisement du milieu, n'apporte plus une cause d'alcalinisation. Mais, dans les régions acides, la formation d'acide oxalique est ralentie ou supprimée ; puis interviennent d'autres causes d'alcalinisation : protéolyse, consommation des molécules acides, si bien que la réaction finale est voisine de *ph* 7.

Les milieux neutres ou peu acides végètent assez longtemps dans la région *ph* 6 : les causes d'alcalinisation et d'acidification se contre-balançant, puis, comme les précédents et dans les mêmes conditions, ils s'acidifient.

Les milieux alcalins voient leur acidité croître de façon continue jusqu'à atteindre les mêmes valeurs que ci-dessus. La culture est très lente au début, car la zone alcaline et neutre est vraiment défavorable au champignon.

Si l'on prolonge suffisamment la culture, la réaction finit dans tous les cas par devenir alcaline et par le même mécanisme. On ne trouve jamais d'ammoniaque dans les jeunes cultures, même par le réactif de Nessler, après distillation. Ce n'est que dans les vieilles cultures, de 20 jours au moins, qu'on en trouve de petites quantités, issues visiblement de la protéolyse.

L'acide oxalique apparaît à l'état de traces dans les cultures 1 et 2 ; dans la série 3, les quantités sont un peu plus abondantes, comme on peut s'y attendre et comme il est indiqué au tableau ci-dessous.

3 mg.	5 au 16 ^e jour.
17,80	au 18 ^e jour.
3,5	au 20 ^e jour.

En prolongeant les cultures, on en obtient des quantités plus fortes comme le montrent les cultures du tableau 63, faites avec 10 % de saccharose, pour obtenir un développement plus abondant.

La convergence du *ph* a été signalée déjà plusieurs fois dans des cultures de microorganismes. Je crois être le premier à avoir expliqué, d'une manière satisfaisante, le mécanisme de cette réaction, dans un cas déterminé.

Dans tous les cas, même en partant de milieux acides, le rendement est assez faible. On peut penser que le fait est dû à ce que le champignon est rapidement entraîné vers la zone *ph* 6, qui lui convient mal. L'emploi de milieux stabilisés (par le citrate de soude) doit améliorer les cultures à point de départ acide et rester sans effet sur les autres. C'est ce que l'expérience vérifie dans une certaine mesure (Tableau 64).

Ici, le citrate de soude intervient seulement par son action tampon, ce qui met en évidence l'importance de cette qualité des milieux,

TABLEAU 63

Nitrate de potasse 1,01 %
 Saccharose 10 %
 PH initial 3,6 et 5

Série 1					Série 2			
Age	PH	Récolte	Ammoniaque (1)	Acide oxalique	PH	Récolte	Ammoniaque	Acide oxalique
0	3,6				5			
6	5,6	0,0642	0	0	5,2	0,01225	0	0
10	5,4	0,1500	0	0	5,45	0,0690	0	traces
14	5,1	0,2351	0	traces	5,2	0,0995	0	traces
22	4,4	0,2802	0	8mm. 9	4,4	0,2455	0	8mm. 9
36	? (2)	0,3315	0,4	57,85	?	0,3295	0,4	62,3

dont la découverte constitue une des plus importantes acquisitions de la physiologie moderne.

TABLEAU 64

Nitrate de potasse 1,01 %
 Saccharose 5 %
 Citrate de soude 0,50 %
 PH initial 4 5,3 7

PH initial	Jours										
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
4	PH	4,2	4,2	4,6	4,4	6,2	6	5,7	6,2	6,4	6,4
	Récolte		0,002			0,195	0,203	0,259	0,303	0,308	0,250
5,3	PH	5,3	5,6	5,6	6	6,1	6,1	5,8	5,6	5,4	
	Récolte			0,026	0,083	0,078	0,150	0,152	0,176	0,152	
7	PH	7,1	7,1	6,8	6,6	6,3	6,2	6,1	5,6	5,2	7,8
	Récolte			0,025	0,038	0,080	0,078	0,088	0,238	0,255	0,278

(1) L'ammoniaque est exprimée en centimètres cubes de solution N/10 pour 5 c. c. de milieu initial.

(2) Le *ph* au 36^e jour n'a pu être déterminé par suite de la coloration intense de la liqueur.

NITRATE D'AMMONIAQUE. — NO^3NH^4 P. M. 80.

Ce sel présente un intérêt particulier du fait que le radical acide est lui-même assimilable. Aussi, bien que l'acide azotique soit un acide presque aussi dissocié que HCl , le milieu de culture ne s'acidifiera probablement pas d'une façon aussi intense. La présence, dans la même molécule, d'azote nitrique et d'azote ammoniacal permet de déterminer, par des dosages comparatifs, la forme de l'azote que le champignon préfère.

Tous les auteurs qui se sont occupés de ce problème, depuis SCHLÆSING et MUNTZ 1878 (152), ont trouvé que le champignon consomme d'abord l'azote ammoniacal et ne s'attaque à l'azote nitrique qu'en dernier lieu. MALFITANO (107), BUTKEWITSCH (30), NIKITINSKY (125), RITTER (146), BRENNER (27) ont donné des chiffres très démonstratifs à ce sujet, tout au moins pour l'*A. niger*. RITTER, en particulier, a trouvé que la consommation de l'ion nitrique était réglée par la dose de nitrate d'ammoniaque employée. Avec de fortes doses (1,68 %), l'ion ammoniacal est consommé presque seul ; l'acidité s'élève fortement et la culture s'arrête. Avec des doses plus faibles (0,42 %), la consommation intégrale de l'ammoniaque, n'amenant pas le champignon hors de la zone favorable, le développement continue aux dépens de l'ion nitrique ; le milieu ne s'alcalinise pourtant pas, car il se produit à ce moment de fortes quantités d'acide oxalique qu'on ne retrouve pas dans le cas précédent.

Les résultats obtenus avec ce corps sont résumés dans les tableaux suivants (65, 66, 67).

Je n'ai pas déterminé systématiquement l'acidité potentielle de ces cultures, car elle ne correspond en aucune façon à l'ammoniaque disparue. Les cultures de la première série se sont accompagnées d'un renversement de la réaction presque dès le début, ce qui rappelle les cultures sur NO^3K . Cela prouve que la consommation de l'ion nitrique débute de bonne heure et même l'emporte sur celle de l'ion ammoniacal. J'ai constaté une légère augmentation du pouvoir tampon et caractérisé des traces d'acide oxalique.

Les cultures de la deuxième et de la troisième séries s'acidifient, mais pas d'une façon aussi intense qu'on pourrait le penser d'après les récoltes obtenues, ou même d'après l'ammoniaque consommée. Ce phénomène est visible dès le début, indiquant une consommation certaine de l'ion nitrique pendant les premières phases de la culture. J'ai également retrouvé une légère augmentation du pouvoir tampon et des traces d'acide oxalique.

TABLEAU 65

Nitrate d'ammoniaque.	0,80 %
Saccharose	5 %
PH initial	3,6

Age	PH	Récolte	Ammoniaque disparue
4	3,6	0,0356	0,30
6	3,4	0,086	0,75
8	3,5	0,1215	2,2
10	3,8	0,1635	1,5
12	4,3	0,2261	1,4
16	4,3	0,2686	1,8
18	4,8	0,2746	1,8
20	5,4	0,2650	1,8
22	5,4	0,2570	1,5
24	5,6	0,2392	1,7

TABLEAU 66

Nitrate d'ammoniaque	0,80 %
Saccharose	5 %
PH initial.	5

Age	PH	Récolte	Ammo- niaque disparue
2	4,2		
4	3	0,027	0,6
6	3,2	0,074	0,9
8	3,6	0,136	1,3
10	3,6	0,188	1,8
12	4	0,228	1,85
14	4	0,228	2,10
16	4	0,282	2,50
18	4,2		2,4
20	4,3	0,362	

TABLEAU 67

Nitrate d'ammoniaque	0,80 %
Saccharose	5 %
PH initial.	8

Age	PH	Récolte	Ammo- niaque disparue
2	7,6		
4	7,2		
6	6,7	0,0034	0,50
8	3,4	0,0578	1,35
10	3,1	0,1541	3,40
12	3,1	0,2038	2,85
14	3,3	0,2118	2,70
18	3,4	0,3299	3,85
20	3,4	0,2544	2,50
22	3,3	0,2980	3,8
24	6,6	0,2582	2,30

Ces preuves, en quelque sorte indirectes, de la consommation précoce de l'ion nitrique, même en présence d'une grande quantité d'ammoniaque, méritent d'être contrôlées par des dosages comparatifs de l'azote disparu, sous ses différentes formes : ammoniacal et nitrique.

C'est ce que j'ai fait dans les expériences résumées aux tableaux 68 et 69.

TABLEAU 68

Nitrate d'ammoniaque. 0,80 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 4,6

Ag.	PH	PH moy.	Récolte	Moy.	Azote amm.	Moy.	Azote nitriq.	Moy.	Rapport NH ³ /NO ³
0	4,6				71,60		71,60		1
4	3,4		0,019		68,95		71,60		
	3,4	3,4	0,030	0,0245	68,60	68,77	72	71,80	0,98
8	4,3		0,086		65,80		70,60		
	4,3	4,3	0,098	0,092	65,10	65,45	70,45	70,52	0,929
12	4,2		0,208		60,20		57,51		
	4,1	4,15	0,194	0,201	60,90	60,55	62,45	59,98	1,01
16	4,4		0,280		56,70		56,93		
	4,3	4,35	0,2632	0,2713	57,40	57,05	57,80	57,35	0,99

TABLEAU 69

Nitrate d'ammoniaque. 0,40 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 4,6

Ag.	PH	PH moy.	Récolte	Moy.	Azote amm.	Moy.	Azote nitriq.	Moy.	Rapport NH ³ /NO ³
0	4,6				36,80		36,80		1
4	3,4		0,0165		32,90		36,80		
	3,2	3,3	0,0245	0,0205	31,50	32,20	37,10	36,95	0,87
8	3,4		0,091		26,60		34		
	3,4	3,4	0,0862	0,0886	29,40	28,00	34	34	0,82
12	4,1		0,1675		25,90		25,78		
	4,3	4,2	0,1376	0,1525	26,60	26,25	26,87	26,32	0,998
16	4,2		0,2180		21,10		26,67		
	4,2	4,2	0,2171	0,2175	23,10	22,10	27,97	27,32	0,81

Les dosages d'azote nitrique ont été effectués par la méthode de

SCHLÆSING, en recevant les gaz dégagés sur la cuve à mercure. Cette méthode, dont la sensibilité n'est pas très grande, est cependant la seule qui soit tout à fait sûre : les méthodes colorimétriques, dans des milieux aussi complexes, sont sujettes à trop de causes d'erreur.

Les conclusions de ces dosages sont extrêmement nettes et confirment les déductions que j'avais déjà tirées du seul examen de la variation du *ph*. A l'inverse de l'*A. niger*, l'*A. repens* attaque donc énergiquement l'ion nitrique en présence d'ammoniaque et d'une façon presque aussi précoce. Cependant la consommation respective des deux formes semble réglée dans une certaine mesure par la réaction initiale.

Dans les milieux acides (*ph* 3,6), la consommation de l'ion nitrique, cause d'alcalinisation, l'emporte sur celle de l'ion ammoniacal, cause d'acidification. Dans les milieux peu acides, *ph* 5 et *ph* 8, la consommation de l'ion ammoniacal est le phénomène prédominant.

Il y a donc, dans la faculté d'attaque des champignons à l'égard de ces deux formes de l'azote, des différences, tout au moins quantitatives, et l'ancienne observation de LAURENT est toujours exacte.

QUATRIÈME PARTIE

ASSIMILATION DES COMBINAISONS ORGANIQUES DE L'AZOTE

CHAPITRE PREMIER

ASSIMILATION DE L'AZOTE AMINÉ DES AMINO-ACIDES.

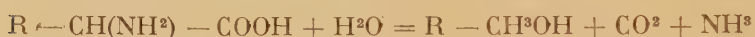
Depuis que l'on sait que les amino-acides sont les constituants essentiels des protéines, leur valeur alimentaire a fait l'objet de nombreuses recherches.

RACIBORSKI 1896 (134), CZAPEK (*l. c.*), NIKITINSKY (*l. c.*), KOSSOWICZ 1914 (88), EMMERLING 1902 (61), ABDERHALDEN et RONA 1906 (1), ABDERHALDEN et TERNUCHI 1906 (2) ont cultivé des espèces très variées sur de nombreux amino-acides. HAGEM (*l. c.*) a fait de même avec les Mucorinées. Des résultats très favorables obtenus, CZAPEK et son école ont voulu conclure que l'acide amino-constituait la forme sous laquelle l'azote était obligatoirement assimilé. Cette opinion, qui n'est plus guère soutenable sous cette forme, sera discutée plus loin. Il est possible, probable même, que l'organisme peut incorporer directement un amino-acide déterminé pour la part qui rentre dans la composition de sa molécule protéique. Mais un de ces corps ne représentant jamais qu'une faible part de cette grosse molécule, l'organisme doit effectuer la synthèse des autres constituants, aux dépens du seul qui lui est offert. L'acide aminé doit donc subir un remaniement préalable qui consiste, comme nous verrons, en une désamination, avec mise en liberté d'ammoniaque et d'un reste acide. L'ammoniaque devient ainsi le véritable point de départ de la synthèse protéique. C'est l'ancienne opinion de NÆGELI (123) et de LÆW (101). On peut essayer de la vérifier en mettant en évidence les deux produits de la réaction, soit l'ammoniaque, soit le reste acide.

C'est l'ammoniaque qui a été caractérisée le plus souvent, mais cette constatation n'a généralement pas une grande valeur, parce que l'ammoniaque apparue dans une culture peut avoir des origines fort diverses. Par suite de la protéolyse, on trouve dans toutes les

cultures un peu âgées de l'ammoniaque secondaire, qui n'a rien à voir avec ces processus de synthèse. C'est ce qui s'est passé par exemple dans les cultures de RACIBORSKI et de HAGEM, prolongées trop longtemps. Dans d'autres cas, les amino-acides ont été utilisés comme source unique de carbone et d'azote ; les besoins en carbone étant de beaucoup prééminents, l'organisme utilise le carbone d'une grande quantité de molécules, laissant en liberté, sous forme d'ammoniaque, un résidu azoté qui lui est inutile. C'est à cette circonstance que sont dues les fortes quantités d'ammoniaque rencontrées notamment par BUTKEWITSCH (l. c.) et KOSSOWICZ (88).

EHRlich et ses collaborateurs (55 à 59) ont au contraire cherché à caractériser le reste acide et pour cela ils se sont adressés à des corps faciles à mettre en évidence et non susceptibles d'être ensuite repris par l'organisme. Ces travaux ont abouti aux résultats suivants : les levures transforment les amino-acides en ammoniaque et alcool homologue inférieur, suivant le schéma :



Ainsi la leucine, l'iso-leucine et la valine conduisent respectivement aux alcools ortho et iso-amylque et à l'alcool iso-butylique, constituants de l'huile de fusel ; la tyrosine, le tryptophane, l'histidine aux tyrosol, tryptophol, histidol, etc.

Les champignons filamenteux : *Oidium lactis*, *Aspergillus niger*, etc., s'arrêtent au stade désamination et respectent l'acide alcool formé.



Ainsi l'*Oidium lactis* transforme la l. tyrosine en acide l. paroxyphényl-lactique et la d. phényl-alanine en acide d. phényl-lactique ; le l. tryptophane en acide l. indol-acétique.

Les amines secondaires et tertiaires se comportent de même. EHRlich n'a jamais pu caractériser avec certitude l'ammoniaque issue de ces réactions, parce qu'elle est engagée aussitôt dans des processus synthétiques. Ces réactions sont l'œuvre, sans doute, d'une désamidase qui n'a d'ailleurs jamais été caractérisée avec certitude. SHIBATA (156), avec la poudre fermentaire d'*Aspergillus niger*, n'a pas obtenu d'ammoniaque avec les amino-acides ordinaires et seulement des traces avec l'asparagine. Cependant DERNBY (47) a pu caractériser chez la levure une désamidase dont le *ph* optimum est voisin de 6. Mais cette enzyme n'agit encore pas sur le glycocolle, l'alanine, la phényl-alanine et n'enlève à l'asparagine que 50 % de

son azote, ce qui amène à penser qu'elle est active seulement sur le groupement CO-NH².

Dans quelle mesure la réaction du milieu peut-elle être modifiée par l'assimilation des amino-acides ? Ces corps sont des électrolytes amphotères qui, à leur point iso-électrique, ne sont que peu ou pas ionisés, mais qui sont susceptibles de se dissocier de deux façons : comme des acides faibles dans la zone acide, comme des bases faibles du côté alcalin. En fait, ces corps ne modifient que peu la réaction du milieu initial et leur pouvoir tampon ne s'exerce qu'à partir de *ph* 4, du côté acide, de *ph* 9 dans la zone alcaline. Mais au cours de l'assimilation, le départ de l'ammoniaque et la formation d'un acide alcool doivent aboutir à l'acidification du milieu et à l'augmentation du pouvoir tampon dans la zone *ph* 4 à *ph* 6.

Or, l'acidification a été observée par de nombreux auteurs déjà. BOAS et LEBERLE (21), avec l'*Aspergillus fumigatus*, cultivé sur l'alanine, ont vu le *ph* passer de 5,70 à 3,50 au troisième jour. Avec *Mycoderma valida* sur glucose + asparagine, le *ph* passe de 4,32 à 2,86. Il faut d'ailleurs être très prudent dans l'appréciation de ces faits. BOAS et LEBERLE (22) ont vu en effet que, suivant l'hydrate de carbone utilisé, le milieu pouvait s'acidifier ou s'alcaliniser. Il semble bien que, dans le cas des acides aminés, le changement de la réaction est lié principalement à la source de carbone. Quant au changement du pouvoir tampon, il n'a fait jusqu'ici l'objet d'aucune recherche.

J'ai utilisé les acides aminés suivants : glyocolle, alanine, valine, leucine, tyrosine, parmi les acides monobasiques ; acide glutamique, acide aspartique et son amide l'asparagine, parmi les acides bibasiques. Pour me mettre à l'abri des phénomènes d'hydrolyse pendant le passage à l'autoclave, surtout dans les milieux acidifiés, j'ai stérilisé les solutions par filtration à la bougie. Cette manipulation et la répartition aseptique qui la suit ne présentent pas de difficultés. Si l'on a à réaliser de longues séries de milieux à des *ph* différents, il convient de ne faire cet ajustage qu'après filtration, en ajoutant aseptiquement l'acide ou l'alcali, d'après les indications de la courbe d'ajustage déterminée d'autre part.

GLYCOLLE (*Acide amino-acétique*). — CH²(NH²)-COOH P.M.75

$$Ka = 1,8 \times 10^{-11}$$

$$Kb = 2,8 \times 10^{-12}$$

Le milieu initial a pour *ph* 5,2. La courbe de neutralisation présente un effet tampon à partir de *ph* 4 (fait utilisé par SÖRENSEN

pour préparer des solutions étalons). Du côté alcalin, l'effet tampon de la fonction amine commence à se faire sentir à partir de *ph* 8,5-9 (Fig. 16-1).

Le glycocolle se montre un assez bon aliment : la récolte maximum est obtenue au 10^e jour (0,320) (Fig. 18). Le milieu s'acidifie d'abord légèrement, puis s'alcalinise régulièrement jusqu'à *ph* 6,4-6,7

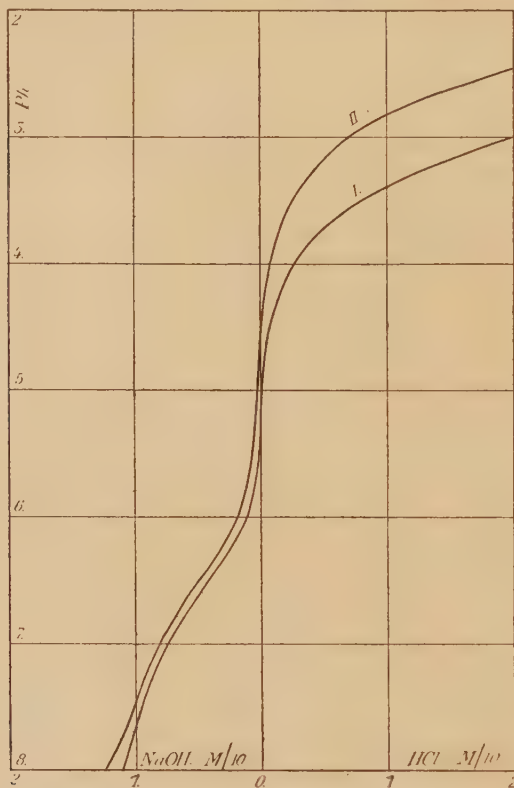


FIG. 16. — Courbe d'ajustage des milieux à base d'acides aminés : 1, Glycocolle ; 2, Asparagine.

(Fig. 17-1). Cette alcalinisation peut être attribuée, soit à la consommation de l'acide glycolique issu de la désamination du glycocolle, soit à la production d'ammoniaque qui atteint au dixième jour un chiffre trop considérable pour être mis uniquement sur le compte de la protéolyse.

Il apparaît de l'acide oxalique, mais seulement vers la fin de la culture, quand le milieu est déjà revenu dans la zone alcaline et ne

renferme plus de sucre. C'est donc de l'acide oxalique de neutrali-

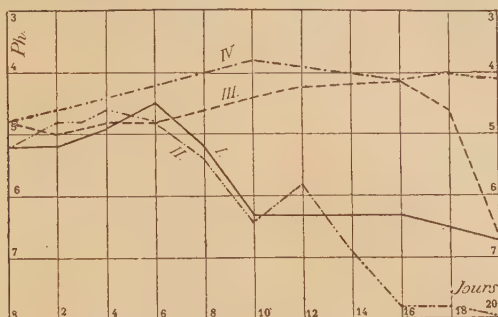


FIG. 17. — Variations du ph sur milieux à base d'acides aminés : 1, Glycocolle ; 2, Alanine ; 3, Valine ; 4, Tyrosine.

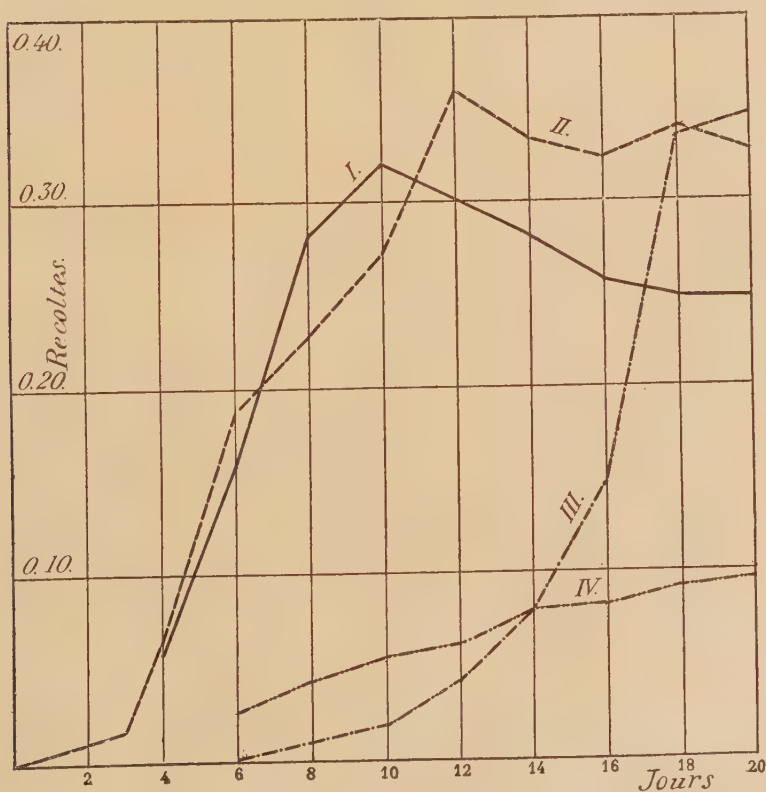


FIG. 18. — Courbes de croissance de l'*Aspergillus repens* sur acides aminés : 1, Glycocolle ; 2, Alanine ; 3, Valine ; 4, Leucine.

sation qui doit exister à l'état d'oxalate d'ammoniaque. L'azote aminé décroît rapidement et, à partir du 14^e jour, on n'en trouve plus que des traces non dosables avec précision.

TABLEAU 70

Glycocolle 0,75 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 5,2

Age	PH	Récolte	Azote aminé (1)	Azote ammoniacal	Acide oxalique	Sucre résiduel	Pouvoir tampon (2)
0	5,2		70				
2	5,2						
4	4,9	0,0595	50	0	0		1,2/1,1
6	4,5	0,1578	40,85	1 mm. 40	0	0,735	1,25/1,1
8	5,2	0,2810	20,50	2,45		0,20	1,1/1,1
10	6,3	0,3200	14,55	13,65	traces	traces	1,9/1,1
14	6,3	0,2814	0,06	26,60	16mm.92	id.	1,1/0,25
16	6,3	0,2572	0	27,30	44,50	0	2,8/1,1
18	6,6	0,2495	0	27,90	48	0	
20	6,7	0,2478	0,06	29,40	54,2	0	2,8/1,1
22	6,2	0,2524	0	26,6	44,5	0	3/1,1
24	6,6	0,2478	0	29,40	56,90	0	

Le pouvoir tampon du milieu augmente d'une façon continue et suit assez bien l'augmentation de l'ammoniaque et de l'acide oxalique présents dans le milieu. Ce résultat ne nous apporte donc pas d'argument nouveau et sûr, en faveur des processus de désamination, puisque l'augmentation observée peut être mise sur le compte de l'acide oxalique, tout au moins en partie. Il convient cependant de remarquer que l'augmentation du pouvoir tampon se fait sentir dans une zone où l'action stabilisante de l'acide oxalique est nulle ou faible.

ALANINE. *Acide α amino-lactique.* — $\text{CH}_3 - \text{CH} (\text{NH}_2) - \text{COOH}$
 P. M. 89

$$\text{Ka} = 2 \times 10^{-10}$$

$$\text{Kb} = 3 \times 10^{-10}$$

(1) Dans ce tableau, comme dans les suivants, l'azote aminé, l'azote ammoniacal et l'acide oxalique sont exprimés en milligrammes et pour les 50 centimètres cubes de la culture.

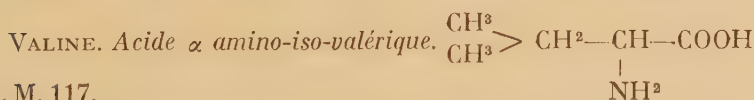
(2) Le pouvoir tampon du milieu a été déterminé entre *ph* 3,4 et *ph* 5.

Le milieu initial a pour *ph* 5,2. L'alanine est un assez bon aliment azoté : la récolte atteint 0,36 au 12^e joar, pour *ph* 5,8. Le *ph*, minimum, atteint le 6^e jour, ne dépasse pas 4,5 ; le milieu revient ensuite vers la zone neutre et même s'alcalinise nettement. Ce fait semble lié à la consommation facile par le champignon de l'acide lactique formé par désamination. Il apparaît des quantités importantes d'acide oxalique dans les dernières phases de la culture, alors que le sucre a presque entièrement disparu ; il s'agit ici encore d'acide oxalique de neutralisation. La transformation de toute l'alanine est complète au 14^e jour.

TABLEAU 71

Alanine.	0,80 %
Saccharose.	5 %
PH initial	5,2

Age	PH	Récolte	Azote aminé	Azote ammoniacal	Acide oxalique	Sucre résiduel	Pouvoir tampon (1)
0	5,2		70				
2	4,8						
3	4,8	0,0170					
4	4,6	0,0640	54,25	0	0	»	1,25/1
6	4,8	0,1875	41,10	0	0	»	1,2/1
8	5,4	0,2280	31,10	7	»	1,32	1,5/1
10	6,4	0,2726	6,15	14,7	5,4	traces	1,9/1
12	5,8	0,3600	3,15	19,60	»	id.	2,5/1
14	6,9	0,3342	0,05	22,75	22,25	id.	6,6/1
16	7,8	0,3235	0,30	20,30	37,40	0	»
18	7,8	0,3405	0,20	21,30	44,50	»	»
20	8	0,3281	0	23,10	65	0	8/1



P. M. 117.

J'ai utilisé le produit racémique. Le *ph* initial du milieu est égal à 5. La courbe d'ajustage présente les mêmes particularités que celle des corps précédents. La culture est d'abord languissante, le voile ne s'organise qu'au 10^e jour ; au 16^e jour, au moment où le *ph* atteint sa valeur minimum (4,15), on a un voile jaune d'or, sans conidies.

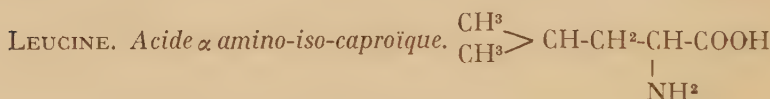
(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 5,2 et *ph* 3,4.

mais qui devient vert olive aussitôt que le milieu s'alcalinise. Il n'apparaît que des traces d'ammoniaque et d'acide oxalique et le pouvoir tampon n'augmente que légèrement.

TABLEAU 72

Valine.	1,18 %
Saccharose	5 %
PH initial.	4,8

Age	PH	Récolte	Azote aminé	Azote ammoniacal	Acide oxalique	Sucre résiduel	Pouvoir tampon (1)
0	4,8		70				
2	5						
4	4,8						
6	4,8	0,0018					
10	4,4	0,0190	56,87				1,2/0,9
12	4,25	0,0416	48,12	0,17			1,7/0,9
14	4,2	0,0785	45,95	0	7,12		1,5/0,9
16	4,15	0,1472	44,35	0,7	16,02	1,55	1,5/0,9
18	4,6	0,3335	29,20	1,40	24,90	0,60	1,5/0,9
20	6,6	0,3466	11,70	15,40	19,58	traces	1,5/0,4
22	6,2	0,4006	26,50	10,68	10,68	0	
24	6,4	0,3631	20,60	9,10	8,90	0	0,9/0,30



P. M. 131. *Ph* initial du milieu complet 5,8.

La l. leucine est un médiocre aliment pour l'*A. repens*. Elle amène la formation d'un mycélium glaireux, blanc sale, sans appareils reproducteurs et dont le poids sec ne dépasse pas 0,10 au 20^e jour. Le *ph* baisse d'abord régulièrement et se maintient à ce niveau pendant toute la durée de la culture. Il ne se forme pas d'acide oxalique et seulement des traces d'ammoniaque. Le pouvoir tampon augmente légèrement. Dans une autre série de cultures faites à *ph* étagés, j'ai trouvé que les milieux neutres ou alcalins donnaient des cultures un peu supérieures et que le *ph* atteignait, dans tous les cas, la valeur 4, qui apparaît ainsi comme une sorte de limite. On peut penser que l'acide alcool formé par désamination est toxique et que cette

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6,4 et *ph* 3,5.

toxicité est liée, comme nous savons, à la fois à sa concentration et à la réaction actuelle des milieux.

TABLEAU 73

Leucine	1,31 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

PH initial	PH final	Récolte	Observations
2,8	2,8	0,005	Flocons compacts, lourds.
4	4	0,0685	Voile blanc sale, très mince.
5	4,05	0,085	Voile blanc, quelques conidiophores.
6	4	0,0812	id.
7	4,3	0,104	id.
8	4,25	0,1033	Voile blanc, flots verts représentant le début de la culture en milieu alcalin.

TABLEAU 74

Leucine	1,31 %
Saccharose	5 %
PH initial.	5,8

Age	PH	Récolte	Ammoniaque
2	5,4		
4	4,2		
6	3,9	0,026	traces
8	4,1	0,0416	id.
10	4,2	0,056	id.
12	4,1	0,0615	id.
14	4,1	0,080	traces
16	4,1	0,081	id.
18	4	0,0915	id.
20	4	0,0952	id.
22	4	0,0995	id.

TYROSINE. *l. p. oxyphényl-alanine*. $\text{C}^6\text{H}^4 \begin{matrix} \text{OH} \\ \diagdown \\ \text{CH}^2\text{-CH-COOH} \end{matrix}$

P. M. 181. $\begin{matrix} \text{NH}^2 \\ | \\ \text{CH}^2\text{-CH-COOH} \end{matrix}$

$$\text{Ka} = 4 \times 10^{-9} \quad \text{Kb} = 4 \times 10^{-14}$$

La tyrosine, étant pratiquement insoluble, a été ajoutée au milieu

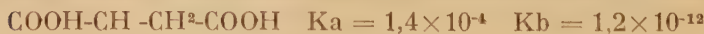
avant stérilisation effectuée, dans ce cas particulier, à l'autoclave à 100°, pendant 20 minutes. A la fin de la culture, le mycélium a été séparé par centrifugation de la tyrosine résiduelle, puis longuement lavé à l'eau bouillante, pour le débarrasser des traces de produit entraîné. La culture est très longue à partir, mais une fois commencée elle atteint des chiffres aussi élevés qu'avec les meilleurs amino-acides ; par contre, le radical de l'acide phényl-lactique qui, d'après la règle d'EHRlich, doit prendre naissance, n'est pas assimilable ; aussi le *ph* se maintient d'une façon constante vers 4 (il faut d'ailleurs remarquer qu'à la fin de la culture il restait encore du sucre). Dans le même ordre d'idées, il ne se forme pas d'ammoniaque. La tyrosine et la leucine se comportent donc d'une façon toute spéciale. Enfin, contrairement à ce que nous avons toujours vu pour les milieux de cette concentration en ions H, on observe une grande quantité de conidiophores, formant un gazon vert olive sur un substratum jaune rougeâtre.

TABEAU 75

Tyrosine	1 %
Saccharose	5 %
PH initial	4,8

Age	PH	Récolte	Ammon.	Sucre	Observations
7	4,1	0,0475	0		Voile mince, jaune d'or.
8	4	0,0680	0		id.
10	3,8	0,108	0		id.
12	3,9	0,165	0		id.
14	4	0,2295	0		Voile vert olive.
16	4,1	0,2250	0		id.
18	4	0,3035	0	0,840	id.
20	4,1	0,3470	0	0,522	Voile vert olive, très cohérent.
22	4,1	0,3345	0,35	0,18	id.
24	4,1	0,4360	0,90		id.

ACIDE ASPARTIQUE *gauche*. *Acide l. amino-succinique*. P.M.135.



L'acide aspartique, dont l'amide est l'asparagine, est un acide bibasique qui se comporte ordinairement comme un acide monobasique, dont la constante de dissociation est de l'ordre de grandeur

TABLEAU 76

Aspartate d'ammoniaque. . . . 0,75 %
 Saccharose 5 %
 Durée 10 jours.

PH initial	PH final	Récolte	Observations
2,8	2,7	0,007	Grumeaux blancs au fond du vase.
3	2,8	0,045	id.
4	5,2	0,288	Voile jaune d'or, plissé, liquide jaune pâle.
6	5,4	0,339	id.
7	5,35	0,384	id.
8	5,3	0,279	id.

TABLEAU 77

Aspartate d'ammoniaque . . . 0,75 %
 Saccharose 5 %
 PH. 5,4

Age	PH	Récolte	Azote aminé	Azote ammoniacal (1)	Sucre résiduel
0	5,4		50,05	67,55	
3	5,3	0,0005	49,45	65,10	
4	5,0	0,0284	49,80	63	
6	4,7	0,2280	49,20	51,80	
8	5	0,2810	43	51,10	1,16
10	5,5	0,3620	39,87	52,50	0,64
12	6	0,3880	36,60	53,55	traces
14	6,6	0,2955	32,50	58,10	
16	6,5	0,2625	27,16	63	
18	6,6	0,2480	25,05	63,70	
20	6,8	0,2481	20,65	65,10	
24	6,8	0,2445	17,83	66,15	
30	7	0,2570	17,10	66,20	

(1) L'azote ammoniacal a été dosé comme d'ordinaire par le procédé Sorensen-Mestrezat, ce qui donne le bloc : azote aminé, + azote ammoniacal. En retranchant l'azote ammoniacal, dosé d'autre part, on obtient l'azote aminé seul. Par ce procédé, dans une solution N/10 en aspartate et renfermant exactement 67 mm. 55 d'azote ammoniacal, je n'ai retrouvé au dosage que 50 mm. 05 d'azote aminé (compte tenu du retard apporté au virage par la présence des sels ammoniacaux).

sur milieux à *ph* variés, montre que l'asparagine est dans tous les cas un bon aliment et que les milieux, quelle que soit leur réaction initiale, convergent tous vers un *ph* moyen (Tableau 78).

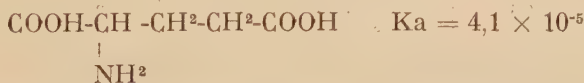
Sur un milieu non ajusté, à *ph* = 4,5, l'asparagine se comporte comme l'alanine ou le glycocolle.

TABLEAU 79

Asparagine.	0,66 %
Saccharose	5 %
PH initial	4,5

Age	PH	Récolte	Azote aminé	Azote ammon.	Sucre résiduel	Pouvoir tampon (1)
0	4,55					
2	4,35					
4	4,3	0,029	59,10	0		0,7/0,35
6	4,25	0,1315	»	1,05		0,7/0,35
8	4,9	0,2410	»	3,85	1,28	0,75/0,35
10	5,1	0,3321	20,45	4,55	0,462	1/0,35
12	7	0,3131	7,75	21	0	1,4/0,35
14	7,1	0,3095	6,90	23,45	»	2,2/0,35
16	7	0,2655	0	31,85	0	
20	6,6	0,2570	3,40	26,60	0	
22	7	0,2612	0	27,30	0	0,5/0,15

ACIDE GLUTAMIQUE. *Acide α amino-glutarique.* — P. M. 147.



Les observations présentées plus haut à propos de l'acide aspartique s'appliquent à l'acide glutamique. J'ai utilisé ce corps à l'état de glutamate d'ammoniaque. L'acide libre donne un milieu à *ph* initial égal à 3,3 et qui ne se prête pas à la culture.

Un essai préliminaire montre que les milieux à *ph* inférieur à 4 ne cultivent pas, ce qui confirme l'observation précédente, car dans de tels milieux, l'acide glutamique, déplacé par HCl, se trouve à l'état libre. L'acide glutamique apparaît ainsi comme un corps toxique, probablement à l'état de molécules non ionisées.

Sous ces réserves, l'acide glutamique est un bon aliment qui permet

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 5 et *ph* 3,4.

d'atteindre 0,4875 au 12^e jour. Je n'ai pas suivi ici le métabolisme de l'azote ammoniacal et de l'azote aminé (Tableaux 80 et 81).

TABLEAU 80

Glutamate d'ammoniaque . . .	0,81 %
Saccharose	5 %
Durée	10 jours.

PH initial	3	4	5	6	7	8
PH final	3	4,4	5,2	5,4	5,4	5,4
Récolte	0	0,2098	0,2847	0,2565	0,2440	0,190

TABLEAU 81

Glutamate d'ammoniaque . . .	0,81 %
Saccharose	5 %
PH initial.	6

Age	PH	Récolte	Sucre résiduel
2	5,8	»	»
4	5,2	0,0445	»
6	5,25	0,185	»
8	5,5	0,3290	0,80
10	6,9	0,4403	traces
12	6,2	0,4875	0
14	7	0,4215	0
16	8	0,3985	0
18	7,2	0,4180	0

CONCLUSIONS. — Les acides aminés sont donc de bons aliments pour l'*Aspergillus repens*, mais ils sont loin de valoir à ce point de vue les sels ammoniacaux des acides faibles. Il est significatif que parmi eux ce soient précisément l'aspartate et le glutamate d'ammoniaque qui donnent les meilleurs résultats, à cause de leur qualité de sel ammoniacal. Si l'on se contente du seul critérium fourni par le poids de la récolte, la théorie de CZAPEK est donc insoutenable.

L'apparition de l'ammoniaque dans les cultures a été rapide et intense, atteignant 40 et 50 % de l'azote offert. Cette ammoniaque provient en partie de la protéolyse, mais en partie seulement, car, dans les mêmes conditions, les cultures sur nitrates et sels ammoniacaux n'en ont pas fourni autant, à beaucoup près. Il est donc cer-

tain qu'une grosse partie de cette ammoniacque provient de la désamination directe de l'acide aminé. Je me propose d'ailleurs de revenir sur ce point. Quant à la mise en liberté du reste acide issu de la désamination, j'estime mes expériences très suggestives à cet égard. Dans tous les cas, le pouvoir tampon entre *ph* 4 et *ph* 6, où s'exerce le pouvoir tampon des acides faibles, a augmenté considérablement. Cela n'est pas dû uniquement à l'apparition de l'acide oxalique, qui n'a jamais été caractérisé chimiquement dans les premières phases de la culture et qui, en sa qualité d'acide fort, exerce son action stabilisante dans une autre zone de l'échelle des *ph*. On peut donc rapporter ce fait, en grande partie, à la transformation de l'aliment azoté.

Les cultures commencent toujours par s'acidifier, mais le *ph* minimum atteint est variable suivant l'amino-acide, le *ph* initial, la quantité de sucre etc. A ce point de vue, les amino-acides utilisés peuvent se répartir en deux groupes. Pour les uns : leucine, tyrosine, qui sont d'ailleurs de médiocres aliments, la concentration des ions H atteint un niveau assez élevé, puis demeure constante. Pour les autres, l'acidification initiale est faible et elle est toujours suivie d'une régression rapide et intense qui amène le champignon dans la zone neutre ou alcaline. Ce renversement de la réaction est dû sans doute à deux facteurs : consommation de la molécule acide, production d'ammoniacque de désamination, puis de protéolyse. Le facteur désamination, d'après ce que nous avons vu, joue probablement le rôle prépondérant (Fig. 17, p. 125).

L'apparition de l'acide oxalique dans les cultures ne se produit que lorsque celles-ci sont placées dans la zone *ph* 5,5. Le sucre a généralement disparu à ce moment. Cet acide n'est donc pas, dans ces conditions, une étape dans la combustion de l'hydrate de carbone. C'est un produit qui prend naissance à l'intérieur des cellules et qui est déversé dans le milieu extérieur, au même titre que l'ammoniacque issue des phénomènes de protéolyse.

INFLUENCE DU POINT ISO-ÉLECTRIQUE DES AMINO-ACIDES SUR LEUR ASSIMILATION.

J'ai été amené à essayer de déterminer l'influence du point iso-électrique des amino-acides sur leur valeur alimentaire. Le point iso-électrique d'un ampholyte est défini par l'expression :

$$ph = \sqrt{\frac{K_a}{K_b} \times K_w}$$

où K_a = la constante de dissociation de la fonction acide,
 K_b » » » » basique
 K_w » » » » de l'eau.

Au point iso-électrique, la dissociation passe par un minimum et même peut s'annuler : la concentration des anions est égale à celle des cations. D'autres propriétés : viscosité, pression osmotique, nombre alcool, passent par un minimum (LOEB 1924) (100). On peut supposer qu'il en est de même de leur valeur alimentaire.

Mes expériences ont porté sur le glyocolle et l'asparagine, dont les points iso-électriques sont respectivement 6,2 et 4,625. J'ai préparé des milieux à la concentration habituelle, mais dont les ph couvrent toute la zone de 2,8 à 8,4. L'expérience a été arrêtée au bout de 8 jours. Malheureusement, au cours de la culture, le ph a varié considérablement, ce qui diminue la netteté des résultats. On peut corriger en partie cette cause d'erreur en faisant la moyenne entre le ph initial et le ph final et rapportant les résultats aux chiffres ainsi obtenus. En portant ces chiffres en abscisses et en ordonnées les récoltes, on obtient des courbes présentant deux maximums, séparés par un minimum, où la récolte est plus faible qu'à droite et à gauche.

Avec le glyocolle, l'existence d'un minimum est assez nette et correspond à ph 6,1 (point iso-électrique 6,2). Du côté alcalin, une circonstance défavorable a certainement empêché une culture plus abondante se traduisant par un maximum plus accusé : c'est le fait que jusqu'à ph 6, le champignon ne végète que lentement (Fig. 23).

Avec l'asparagine, dont le point iso-électrique est à ph 4,62, cet inconvénient sera moins sensible. D'autre part, pour atténuer l'amplitude des changements de réaction, j'ai stabilisé le milieu avec 0,50 % de citrate de soude. Le minimum se produit à ph 4,7. Les deux maximums sont ici encore très inégaux : 0,2716 et 0,171 (Fig. 24).

On remarquera d'autre part la convergence du ph qui aboutit dans tous les cas à amener le milieu vers la région ph 4,5- ph 5, c'est-à-dire dans la zone du point iso-électrique.

Ces faits doivent être interprétés avec prudence, car suivant que l'on arrête la culture plus ou moins tôt, le ph final est variable : en fait, toutes les cultures âgées deviennent alcalines, à la suite des réactions que j'ai précisées à plusieurs reprises.

Il n'en reste pas moins que pendant les premiers jours du dévelop-

pement, les cultures acides s'alcalinisent et les cultures alcalines s'acidifient. Peut-être faut-il voir là l'influence du mode de dissociation de l'acide aminé, avec un mode d'attaque différent, de part et d'autre du point iso-électrique.

TABLEAU 82

Glycocolle . . . 0,75 %
Saccharose . . . 5 %
Durée 8 jours.

TABLEAU 83

Asparagine. . . . 0,66 %
Saccharose 5 %
Citrate de soude. . . 0,5 %
Durée 8 jours.

PH initial	PH final	PH moyen	Récolte
2,8	2,9	3,85	0,021
3,2	4,2	3,7	0,1960
3,6	4,5	4,05	0,1955
4	5,4	4,7	0,2616
4,4	5,3	4,85	0,2126
4,8	5,3	5,05	0,271
5	5,4	5,2	0,305
5,2	5,3	5,25	0,300
5,6	5,3	5,45	0,2095
5,8	5,3	5,55	0,2760
6	4,95	5,47	0,2373
6,2	4,8	5,5	0,2445
6,4	5,1	5,75	0,0835
6,6	4,9	5,75	0,180
6,8	5,4	6,1	0,0465
7	5,30	6,15	0,104
7,2	5,4	6,3	0,095
7,4	6	6,7	0,0575
7,6	5,5	6,55	0,0725
7,8	5,3	6,55	0,0845
8	6,3	7,1	0,0705
8,4	5,9	7,15	0,039

PH initial	PH final	PH moyen	Récolte
2,8	2,8	2,8	0,0195
3,2	3,5	3,35	0,104
3,4	4,2	3,8	0,146
3,6	4,4	4	0,1978
3,8	4,5	4,15	0,2388
4	4,8	4,4	0,2716
4,2	4,7	4,45	0,1425
4,4	4,8	4,6	0,1213
4,6	4,8	4,7	0,113
5	5	5	0,120
5,2	4,9	5,05	0,171
5,4	4,9	5,15	0,179
5,6	5,2	5,4	0,092
5,8	5,3	5,55	0,0605
6	5,4	5,7	0,061
6,2	5,45	5,825	0,0766
6,4	5,55	5,975	0,0614
6,8	5,8	6,4	0,0445
7,2	6,1	6,65	0,044
7,6	6,3	6,95	0,028
8	6,4	7,3	0,027
8,4	6,6	7,5	0,039

Ces résultats, qui indiquent un minimum différent suivant l'ampholyte utilisé, sont en désaccord avec l'hypothèse d'un minimum créé par le point iso-électrique des protéines du champignon. Ce minimum serait alors situé au même point dans tous les cas. Nous verrons d'autre part que la peptone qui, étant un complexe, ne saurait avoir de point iso-électrique défini, ne présente pas non plus de courbe de croissance à deux maximums séparés par un minimum.

CHAPITRE II

ASSIMILATION DE L'AZOTE AMIDÉ DES AMIDES.

Les amides sont des corps qui s'hydratent facilement pour donner le sel ammoniacal correspondant ; il est probable que les champignons peuvent effectuer cette réaction par l'action d'une désamidase qui a été signalée par divers auteurs [SHIBATA 1903 (*l. c.*), DOX et NEIDIG (51)]. Il faut évidemment, pour que l'amide soit assimilable, que le sel ammoniacal soit lui-même assimilable, ou plus exactement dépourvu de toxicité. Il faudra également éviter la stérilisation à l'autoclave, qui réalise précisément cette hydratation, en dehors de toute action diastasique.

Parmi les amides de la série acétique, l'acétamide et la propionamide ont seules donné de bons résultats à CZAPEK (*l. c.*), qui d'ailleurs s'en étonne, à cause de la toxicité des sels ammoniacaux correspondants. Il en conclut que l'absorption se fait sans hydrolyse préalable et par incorporation directe de l'amide dans la molécule protoplasmique. Mais j'ai établi plus haut le mécanisme et les limites de la toxicité des sels de la série acétique. Celle-ci est assez faible pour ne pas exclure l'hypothèse d'une hydratation qui d'ailleurs doit être progressive. Les amides des acides alcools et des acides bibasiques (oxamide, succinamide) lui ont donné d'excellents résultats. Il faut noter que CZAPEK stérilisait ses milieux par filtration.

LUTZ (105) a cultivé l'*Aspergillus niger*, l'*Aspergillus repens* et le *Penicillium glaucum* sur les 4 premières amides grasses qui lui ont donné des récoltes très élevées, surtout avec l'*Aspergillus niger*. Mais il a stérilisé ses milieux à l'autoclave, ce qui lui a donné sans doute un mélange d'amide et de sel ammoniacal.

Les Mucorinées (HAGEM, *l. c.*) donnent des récoltes médiocres, comme BIEREMA (12) l'avait déjà constaté pour *Mucor racemosus*. PURIEWITSCH (*l. c.*) a obtenu des résultats du même ordre que ceux de CZAPEK, avec une perte d'énergie très variable suivant les cas.

KOSSOWICZ (86), qui a utilisé dans ses recherches 10 espèces différentes, parmi lesquelles l'*Aspergillus glaucus*, a obtenu de bons développements avec une amide d'une nature un peu spéciale : l'acide hippurique.

BRENNER (*l. c.*), qui stérilise ses milieux par la chaleur, a obtenu des récoltes particulièrement élevées avec la formiamide. Le milieu

devient très acide et ne renferme pas d'acide oxalique. BRENNER penche pour l'hypothèse d'une hydratation de l'amide.

BOAS 1919 (17) considère que la valeur alimentaire des amides est encore plus faible qu'il ne ressort de la littérature. Sauf avec la formiamide, la culture est très lente finissant pourtant par donner des récoltes assez élevées (0,30 au bout de 4 semaines). Par contre les amides grasses exercent une action favorisante très nette sur l'apparition des conidies (*Aspergillus niger et glaucus*).

Enfin, plus près de nous, WAKSMAN (169) a constaté que les *Actinomyces* sont à peu près incapables d'assimiler les amides : le milieu devient acide avec l'acétamide et alcalin avec l'urée.

Il résulte de cette revue rapide que les amides se comportent généralement comme des aliments médiocres. Cela peut être dû : soit à une action toxique indépendante de leur valeur alimentaire, soit à une inaptitude du champignon à utiliser l'azote amidé, soit aux deux causes simultanément.

Mes expériences ont porté sur la formiamide et l'acétamide. Les milieux, préparés comme d'ordinaire, ont été stérilisés par filtration à la bougie. Un essai préliminaire m'a donné, avec ces deux corps, un résultat négatif.

FORMIAMIDE. — H CO NH_2 P. M. 45.

Trois séries de milieux ont été préparées avec des concentrations décroissantes en formiamide. Dans chaque série des témoins ont été additionnés de 0,75 % d'asparagine. *ph* initial = 4,6.

Au bout de 10 jours d'étuve, il n'y a eu de développement que sur le milieu N/100 additionné d'asparagine. On peut en déduire que la formiamide, aux concentrations où on l'utilise d'ordinaire, est toxique et qu'il faut abaisser fortement cette concentration pour permettre une culture normale, en présence d'une source convenable d'azote. En l'absence d'asparagine, la formiamide seule n'a donné que quelques flocons, ce qui témoigne d'une inaptitude du champignon à utiliser l'azote amidé (Tab. 84).

Mais ce dernier résultat peut être dû à la réaction du liquide. Les ferments protéolytiques des champignons, dont l'amidase n'est qu'une variété, agissent mieux en milieu neutre ou alcalin et sont plus ou moins inhibés en milieu acide. J'ai donc fait une nouvelle série de cultures avec un milieu amené à *ph* 7. Je n'ai obtenu encore qu'une récolte insignifiante, constituée par quelques flocons glaireux, immergés dans un liquide brunâtre et, fait inattendu, le liquide s'est fortement acidifié (Tableau 85).

La formiamide ne peut donc se prêter à une culture, pour deux raisons :

1^o Elle est toxique ; 2^o elle est à peu près inassimilable. Cependant le changement considérable de réaction indique un début d'utilisation. Il est très possible qu'un mycélium bien constitué soit capable de produire des ferments assez actifs pour conduire à une utilisation satisfaisante de l'amide.

TABLEAU 84

Formiamide N/10 N/31,25 N/100
Saccharose 5 %
Durée 10 jours.

Concentrations	1 ^o Sans asparagine			2 ^o Avec asparagine		
	N/10	N/31,25	N/100	N/10	N/31,25	N/100
PH	4,6	4,6	5	4,6	4,6	6,6
Récolte	0	0	quelques flocons	0	0	0,341

TABLEAU 85

Formiamide 0,0045 %
Saccharose 5 %
PH initial. 7

Age	3	6	10	12	15	20
PH	6,4	4,8	4,6	4,4	4,3	4,2
Récolte	0	0	?	0,002	0,0015	0,001

L'ACÉTAMIDE. — $\text{CH}_3\text{-CO NH}_2$ P. M. 76.

L'acétamide a donné des résultats du même ordre, avec cependant une récolte un peu plus abondante dans le milieu à *ph* initial 7.

TABLEAU 86

Acétamide N/10 N/31,25 N/100
Saccharose 5 %
Durée 10 jours.

Concentrations	1° Sans asparagine			2° Avec asparagine		
	N/10	N/31,25	N/100	N/10	N/31,25	N/100
PH	4,7	5	4,7	4,6	5	6,7
Récolte.....	0,002	0,005	0,005	0,058	0,046	0,362

TABLEAU 87

Acétamide 0,0076 %
 Saccharose 5 %
 PH initial 7

Age	3	6	10	12	15	22
PH	6,7	4,8	4,8	4,6	4,3	4,2
Récolte	»	»	0,0055	0,075	0,018	0,045

CHAPITRE III

ASSIMILATION DE L'URÉE.



L'urée, vu son importance particulière en physiologie, a fait l'objet de nombreux travaux, qu'on trouvera résumés dans le travail de BRENNER 1914 (*l. c.*). L'urée s'est toujours montrée un excellent aliment pour les moisissures qui la transforment vraisemblablement en carbonate d'ammoniaque par l'action d'une uréase, décrite d'abord par SHIBATA, et dont la diffusion chez les champignons de tout ordre est si considérable, [SCHMITZ, et ZELLER (154), GORIS et COSTY (68)]. Mais l'action de cette uréase est intracellulaire et l'ammoniaque n'apparaît pas dans les jeunes cultures. Ce n'est que dans les cultures âgées que celle-ci s'accumule en quantités notables, provenant alors, soit de la protéolyse, soit de l'action de l'uréase extravasée dans le milieu, par suite de la dégénérescence des cellules. L'alcalinisation des cultures ne doit donc pas être rapide.

BOAS et LEBERLE (21), avec l'*Aspergillus fumigatus*, ont vu la réaction passer de *ph* 5,7 à *ph* 5,28 au 4^e jour, pour revenir vers *ph* 6 où elle se maintient. Avec les levures, l'acidification initiale est beaucoup plus considérable et atteint *ph* 3,57 au 11^e jour.

Mais il y a des espèces qui produisent une hydrolyse diastasique de l'urée si considérable qu'il en résulte une alcalinisation intense du milieu. Ainsi un *Cladosporium sp.*, produit une telle quantité d'ammoniaque que le mycélium ne tarde pas à mourir. Avec l'*Aspergillus niger* lui-même, si on remplace le saccharose par le maltose qui ne se prête pas à une formation aussi considérable d'acide oxalique, on observe une réaction très alcaline $H = (10^{-7.5})$, se traduisant, ici encore, par un empoisonnement du champignon (Boas, 18).

L'urée est un corps neutre, non ionisé, qui ne modifie pas la courbe d'ajustage telle qu'elle est définie par PO_4KH_2 . Le milieu n'est donc pas stabilisé et les variations du *ph* auront une amplitude très grande pour des quantités très faibles d'acide ou d'alcali mises en œuvre. Enfin, si, comme on peut s'y attendre, il se produit de l'acide oxalique, le fait se traduira par une modification très nette du pouvoir tampon.

TABLEAU 88

Urée	0,30 %
Saccharose	5 %
PH initial.	4,8

Age	PH	Récolte	Ammon.	Acide oxalique	Sucre résiduel	Pouvoir tampon (1)
2	4,9					
4	4,8	0,003	0,35	0		
6	6	0,028	3,5	0		0,6/0,3
8	5,8	0,1082	5,95	9		0,8/0,3
10	5,2	0,1605	11,2	11,2	1,344	2/0,3
12	5,05	0,2578	9,1	15,2	0,41	2/0,3
14	5,7	0,2531	19,25	»	traces	2,5/0,3
16	6,2	0,2334	17,85	16		3/0,3
20	6,6	0,1995	18,2	21,40		3/0,3
22	6,5	0,1800	19,60	»		3/0,3

On remarquera la similitude qui existe entre les cultures à l'urée

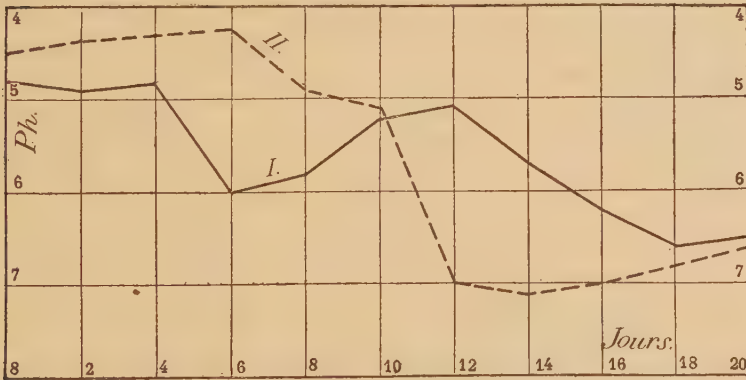


FIG. 19. — Variations du *ph* sur milieux à base : 1° d'urée ; 2° d'asparagine

et les cultures sur nitrate de potasse : alcalinisation initiale, suivie d'une acidification momentanée, puis alcalinisation. C'est qu'ici encore nous sommes en présence d'un double phénomène : production continue d'ammoniaque, source d'alcalinisation ; production d'acide oxalique dans certaines zones favorables, cause d'acidification. L'acidification très nette observée entre le 8^e et le 12^e jour

(1) Le pouvoir tampon a été déterminé entre *ph* 6 et *ph* 3,2.

correspond à une production considérable d'acide oxalique qui se traduit encore par l'augmentation du pouvoir tampon.

En répétant cette expérience avec des milieux plus acides ou alcalins, on obtiendra des résultats toujours comparables à ceux du nitrate de potasse.

Je me suis contenté dans ces expériences de déterminer la récolte et le *ph*.

TABLEAU 89

Urée 0,30 %
 Saccharose 5 %
 PH initial. 3,4

Age	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	
PH $\left\{ \begin{array}{l} \text{PH} \\ 3,4 \end{array} \right.$	PH Récol.	3,45 »	3,8 »	3,6 0,043	4,8 0,2395	5,5 0,2995	6,6 0,3585	7 0,2905	5,4 0,3035	6,1 0,275	6 0,281
PH $\left\{ \begin{array}{l} \text{PH} \\ 7,6 \end{array} \right.$	PH Récol.	7,5 »	7 »	6,7 0,013	5,9 0,0905	6,2 0,0207	6,2 0,035	5,1 0,205	5,1 0,200	5,35 0,2052	4,8 0,219

J'ai fait d'autres expériences avec le citrate de soude pour stabiliser le milieu. Cet artifice améliore les récoltes, mais aboutit surtout à une alcalinisation intense du milieu, par suite de la consommation de l'ion citrique; une fois le sucre disparu.

TABLEAU 90

Urée 0,30 %
 Saccharose 5 %
 Citrate de soude. 0,50 %
 PH initial 6,4

Age	2	4	6	8	10	12	14	16	20
PH ... Récolte.	6,4 »	6,2 »	6,1 0,0245	5,7 0,105	5,6 0,219	8,4 0,390	8,4 0,3965	8,9 0,375	8,5 0,3725

L'urée apparaît ainsi comme un aliment de valeur moyenne pour l'*A. repens*. Il se forme au cours de la culture des quantités considérables d'ammoniaque que l'on ne peut pas mettre exclusivement sur le compte de la protéolyse : le champignon peut donc réaliser l'hydratation de l'urée par un ferment qu'il y aurait lieu d'isoler.

CHAPITRE IV

FONCTIONS AZOTÉES DIVERSES.

J'ai également examiné la valeur alimentaire de quelques autres corps appartenant à diverses fonctions azotées : imides, oximes, amidines.

L'ACÉTOXIME aux concentrations N/10, N/31,25, N/100 n'a donné aucune culture (*ph* initial 5,2 à 4,8).

La SUCCINIMIDE $\left. \begin{array}{l} \text{CH}^2\text{-CO} \\ | \\ \text{CH}^2\text{-CO} \end{array} \right\} \text{NH}^2$ a donné d'assez bons résultats,

CZAPEK signale déjà le fait, avec l'*Aspergillus niger*, et pense que l'assimilation de ce corps se fait sans doute en partie sous forme de pyrrolidine. Cette hypothèse compliquée et peu vraisemblable est nécessitée par l'idée que se faisait CZAPEK du peu de valeur des sels ammoniacaux. Ici, il est plus naturel d'admettre l'assimilation sous forme de sel ammoniacal, comme le montrent les grandes quantités d'ammoniaque qui prennent naissance. Dans ce cas particulier, l'ammoniaque a été dosée à froid, par le procédé SCHLÆSING (Durée du contact de l'alcali : 48 heures).

TABLEAU 91

Succinimide 0,99 %
Saccharose 5 %
PH initial. 4,8

Age	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
PH	4,8	4	4	4	4,1	4,2	4,6	5	5,1	5,4
Récolte .	»	»	0,0051	0,0265	0,058	0,097	0,1232	0,1292	0,1422	0,220
Ammon. .	»	»	»	1,57	3,95	7,2	9,90	13,55	12,50	17,50

La GUANIDINE $\text{NH} = \text{C} \begin{array}{l} \text{NH}^2 \\ \text{NH}^2 \end{array}$ P. M. 59 a été utilisée sous forme de carbonate de titre inconnu. D'après la teneur en acide carbonique, j'ai pu réaliser un milieu approximativement N/10 en

azote. Ce milieu, comme dans les cas qui précèdent, a été stérilisé par filtration à la bougie.

La guanidine ne fournit que des résultats médiocres. On n'observe pas la mise en liberté d'ammoniaque et le milieu, après s'être légèrement acidifié, conserve cette concentration en ions H. D'après Kossowicz (87), la guanidine est absorbée après transformation en ammoniacque.

TABLEAU 92

Carbonate de guanidine 0,60 %
 Saccharose 5 %
 PH initial. 7

Age	1	5	6	8	10	12	14	16	18
PH	7	6,8	6,4	6,1	5,7	4,7	4,6	4,3	4,7
Récolte .	»	»	0,015	0,050	0,009	0,0675	0,066	0,0935	0,0778

CHAPITRE V

ASSIMILATION DE LA PEPTONE.

La peptone, dont la valeur alimentaire pour les bactéries est si importante, est également un bon aliment pour les champignons inférieurs, à la condition de se trouver en présence de sucre. Dans ce cas, son utilisation s'accompagne des mêmes variations de l'acidité que chez les amino-acides. Ainsi KLOTZ 1923 (84) a vu la réaction passer, dans le cas de l'*Aspergillus niger*, de ph 5,5 à ph 3,9 au 3^e jour, puis revenir vers ph 6,4, où elle se maintient jusqu'à la fin de la culture. Avec *Diplodia natalensis*, l'alcalinisation est plus considérable et atteint ph 8,4. BOAS (16) avait observé, chez la première espèce, une acidification plus considérable, faisant descendre le ph à 2,8. D'une façon générale, il ne se produit des quantités appréciables d'ammoniaque qu'une fois le sucre disparu.

En l'absence de tout autre composé susceptible de servir de source de carbone, la peptone peut couvrir à la fois les besoins en carbone et en azote, mais la marche de la culture est alors tout à fait différente et le phénomène prédominant, connu depuis longtemps, est la production d'une grande quantité d'ammoniaque. BUTKEWITSCH (30), qui a étudié la dégradation de la peptone avec divers champignons inférieurs, a observé l'hydrolyse presque complète en ammoniaque, avec stade intermédiaire amino-acide. L'*Aspergillus niger* pousse jusqu'au stade ammoniacque, par suite de la production simultanée d'une grande quantité d'acide oxalique qu'il faut neutraliser. En présence de CO_3Ca , qui neutralise cet acide, la dégradation s'arrête au stade amino-acide : on arrive ainsi à observer la cristallisation de la leucine et de la tyrosine dans le milieu. Les champignons qui ne produisent pas d'acide oxalique, comme les *Penicillium*, s'arrêtent au stade amino-acide et ne donnent que peu d'ammoniaque.

D'ailleurs les récoltes obtenues sont faibles et l'on traduit le fait en disant que la peptone, tout en étant une bonne source d'azote, est une mauvaise source d'énergie. PURIEWITSCH (l. c.) a montré que son utilisation s'accompagne d'une perte d'énergie considérable, même en présence de sucre. BRENNER (l. c.) attribue ces résultats médiocres au fait que la diastase hydrolysant la peptone n'agit qu'en milieu neutre ou alcalin, comme on le sait depuis les travaux de MALFITANO et que cette réaction convient mal aux champignons

inférieurs. Ceux d'entre eux qui s'accoutument bien de cette réaction donnent avec la peptone des résultats plus favorables (HAGEM, l. c.).

C'est qu'en effet la consommation de la peptone, en l'absence de sucre, est une cause d'alcalinisation intense des milieux, par suite précisément de l'ammoniaque résiduelle. Suivant que la production

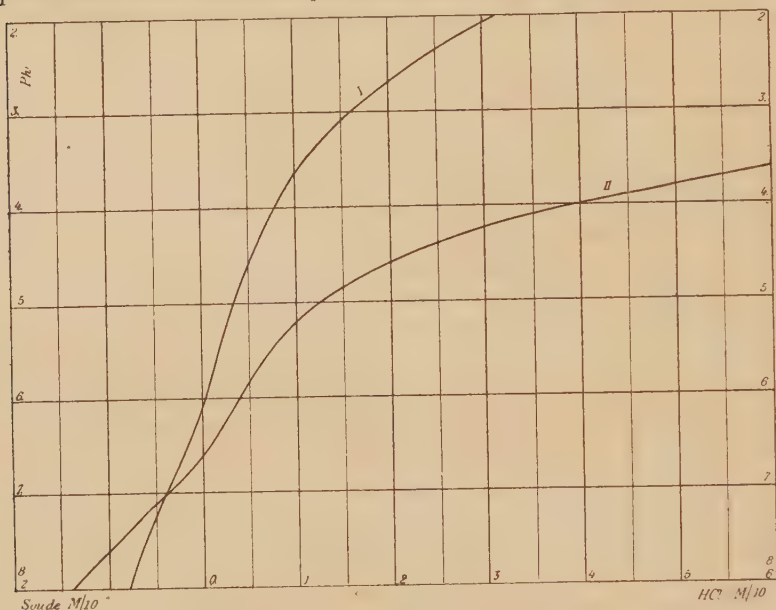


FIG. 20. — Courbe d'ajustage des milieux peptonés : 1, Peptone 1 % ; 2, Peptone 5 %.

d'acides, comme l'acide oxalique, neutralise plus ou moins cette ammoniaque, la réaction se maintient plus ou moins près de la neutralité. KLOTZ (l. c.) avec l'*Aspergillus niger*, n'a pas vu la réaction aller au delà de ph 6,5.

J'ai utilisé la peptone DIFCO qui donne un milieu assez bien stabilisé, sauf dans la région ph 5 à ph 6 (Fig. 20). Lorsqu'on emploie la peptone en présence de sucre, elle se comporte à peu près comme un acide aminé. La culture est très rapide et atteint 0,4006 au 8^e jour, cependant que le ph passe de 6,2 à 4,6. Il reste encore du sucre (0,45). La réaction se renverse à ce moment et revient vers l'alcalinité ; le mycélium perd rapidement, par protéolyse, près du tiers de son poids. Il n'apparaît que des quantités relativement faibles d'ammoniaque et d'acide oxalique.

La peptone favorise la formation de conidies : le voile jaune obtenu au début de la culture est toujours recouvert de nombreuses conidies vertes, alors que, dans les mêmes conditions de réaction et de pression osmotique, on obtient généralement un voile privé de conidies.

TABLEAU 93

Peptone 1 %
 Saccharose 5 %
 PH initial. 6,2

Age	PH	Récolte	Azote ammo- niacal	Acide oxalique	Sucre résiduel
2	6				
4	4,8	0,1270			
6	4,6	0,3301	0,20		
8	4,6	0,4005	0,70		0,45
10	5,8	0,3512	1,84		traces
14	6	0,2540	2,62		traces
16	6	0,3135	1,75	16	
20	6,4	0,2702	5,42	16	
22	6,4	0,2435	5,51	17,8	
24	6,4	0,240	8,40	4,47	

TABLEAU 94

Peptone 5 %
 PH initial. 6,2

Age	PH	Récolte	Azote ammo- niacal	Acide oxalique
2	6,4			
4	7,4	0,0235		
6	8,2	0,045	10,92	
8	7,8	0,070	16,40	
10	7,2	0,0442	18,70	
12	7,2	0,0574	21,25	
16	6,8	0,0668	26,90	105,2
18	6,7	0,0628	36,60	122,80
20	7,1	0,0728	36,60	114,80
22	6,8	0,0746	14,30	124,60

En l'absence de sucre, on n'obtient pas des résultats aussi favo-

rables. Avec 5 % de peptone, la culture ne dépasse pas 0,07 au 20^e jour. D'ailleurs, il apparaît une quantité considérable d'ammo-



FIG. 21. — Variations du pH sur milieux peptonés : 1, Peptone 1 %, saccharose 5 % ; 2, Peptone 5 %, saccharose 0, pH initial 6,2 ; 3, Peptone 5 %, saccharose 0, pH initial 3,6.

niaque, s'accompagnant d'une alcalinisation précoce du milieu ; le

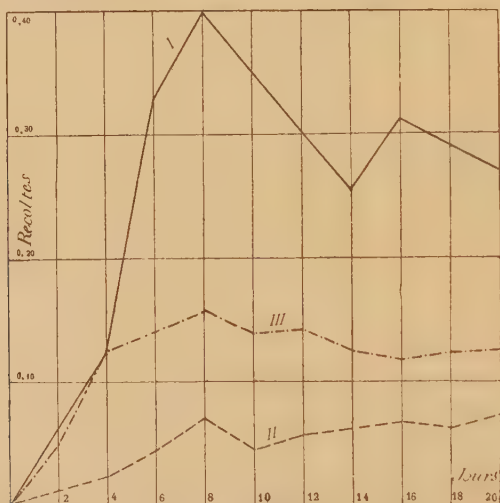


FIG. 22. — Courbes de croissance sur milieux peptonés : 1, Peptone 1 %, saccharose 5 % ; 2, Peptone 5 %, saccharose 0, pH initial 6,2 ; 3, Peptone 5 %, saccharose 0, pH initial 3,6.

pH atteint la valeur 8,2 au 6^e jour. Le milieu s'acidifie ensuite, par formation d'une grande quantité d'acide oxalique.

Les faibles résultats obtenus ne traduisent sans doute pas exactement la valeur alimentaire de la peptone : en fait, le champignon est maintenu constamment dans la zone *ph* 6 et au-dessous et ne peut réaliser une réaction plus favorable. C'est à cette circonstance qu'il faut certainement rapporter les résultats médiocres obtenus. Il doit suffire de partir d'un milieu plus acide pour obtenir une meilleure récolte (Fig. 22). Les résultats résumés au tableau 95 montrent bien qu'il en est ainsi. En partant d'un milieu plus acide, on a doublé le poids de la récolte. L'alcalinisation a d'ailleurs été très rapide ; on remarquera les quantités énormes d'ammoniaque produites. L'azote aminé, après une diminution initiale, se maintient constant. Il ne se produit que peu d'acide oxalique, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre.

TABLEAU 95

Peptone 5 %
PH initial. 3,6

Age	PH	Récolte	Azote ammo- niacal	Azote aminé	Acide oxalique
2	4,2	0,050	16,10	51,95	
4	6,7	0,127	57,75	41,71	
8	8	0,157	74,20	21,71	
10	8,1	0,139	77	23,30	5,34
12	8,4	0,1425	79,10	25,65	8,95
14	8	0,1246	79,80	25,85	14,27
16	8,6	0,1185	79,45	28,35	8,90
18	8,2	0,1228	86,80	22,80	10,70
20	8,4	0,1255	91,70	23,50	19,60

INFLUENCE DE LA RÉACTION INITIALE SUR L'ASSIMILATION DE LA PEPTONE.

On a vu plus haut que les acides aminés possèdent un point iso-électrique et que la courbe des récoltes obtenues sur milieux à *ph* variés passe à ce niveau par un minimum. La peptone étant un mélange non défini de polypeptides et d'amino-acides, ne possède pas de point iso-électrique et la courbe des récoltes ne doit pas présenter de minimum entre deux maximums.

Les expériences résumées dans les tableaux 96 et 97 se traduisent

par une courbe en plateau entre *ph* 4 et *ph* 7, avec des oscillations qui ne dépassent pas cinq centigrammes. J'ai répété ces expériences, avec des résultats du même ordre (Fig. 25).

La forme différente de la courbe de croissance dans le cas des acides aminés et de la peptone peut donc être rapportée à la présence ou à l'absence de point iso-électrique. Si le minimum observé dans certains cas était dû à une propriété de même ordre des protéines du champignon, on devrait le retrouver avec tous les aliments et au même niveau dans tous les cas. Or, nous avons vu que ce minimum varie suivant les amino-acides utilisés et correspond assez bien à leur point iso-électrique ; comme contre-partie, la courbe en plateau de la peptone est particulièrement démonstrative. Nous discuterons plus loin ce point.

TABLEAU 96

Peptone. 1 %
Durée 8 jours.

PH initial	PH final	PH moyen	Récolte
3,8	3	3,4	0,0245
4	3	3,5	0,1950
4,2	3	3,6	0,2335
4,4	4	4,2	0,2375
4,6	4,1	4,35	0,2760
4,8	4	4,6	0,290
5	4	4,5	0,3014
5,2	4,5	4,85	0,2998
5,4	4,4	4,9	0,3030
5,6	4,8	5,2	0,3290
5,8	4,9	5,35	0,3051
6	5	5,5	0,2965
6,2	5,2	5,7	0,267
6,4	5,6	6	0,2805
7	5	6	0,2902
7,2	5,2	6,2	0,2185
7,6	5,8	6,7	0,1076
8	5,6	6,8	0,1520
8,4	6,6	7,5	0,066

TABLEAU 97

Peptone 1 %
Durée 7 jours.

PH initial	PH final	PH moyen	Récolte
2,6	2,6	2,6	0
3	2,9	2,95	0,0986
3,4	3,2	3,3	0,1775
3,8	3,4	3,6	0,1995
4,2	4,35	4,27	0,2608
4,6	4	4,3	0,235
4,8	4,2	4,5	0,2520
5	4,25	4,625	0,2704
5,2	4,3	4,75	0,2630
5,4	4,3	4,85	0,2339
5,6	4,3	4,95	0,272
5,8	4,6	5,2	0,2498
6	4,4	5,2	0,2409
6,2	4,5	5,35	0,2263
6,6	4,5	5,55	0,2856
6,8	4,8	5,8	0,2810
7	5	6	0,2027
7,2	4,9	6,05	0,2136
7,4	5	6,2	0,1948
7,8	5,2	6,5	0,1850
8,2	6	7,1	0,0802

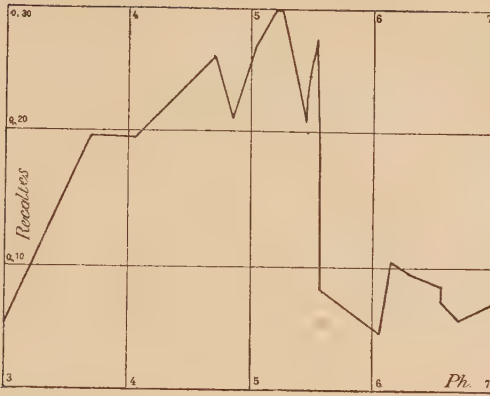


FIG. 23. — Milieu au glycolle. Influence du point iso-électrique.

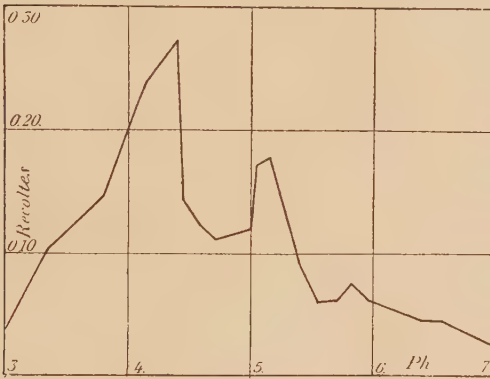


FIG. 24. — Milieu à l'asparagine. Influence du point iso-électrique.

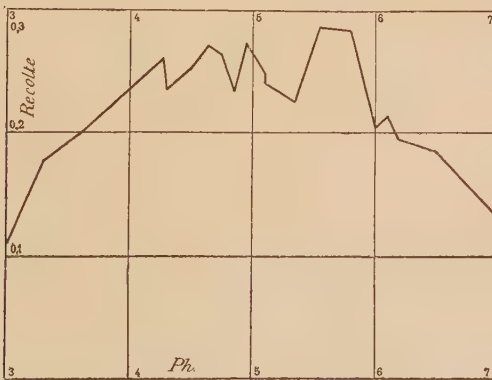


FIG. 25. — Milieu à la peptone. Influence du pH initial.

CONCLUSIONS

Il convient maintenant de dégager les conclusions qu'on peut tirer de cette longue série de résultats. Je suivrai pour cela la division adoptée dans l'exposé historique et j'envisagerai :

1° L'influence de la réaction du milieu de culture sur le champignon ;

2° Les changements de réaction produits dans le milieu par l'utilisation des diverses formes de l'azote ;

3° La valeur alimentaire des diverses formes de l'azote.

PREMIÈRE PARTIE

INFLUENCE DE LA RÉACTION DES MILIEUX SUR LE CHAMPIGNON

On peut commodément grouper le résultat de mes observations sous divers titres et examiner successivement la germination des conidies, la production de mycélium, la formation de cellules géantes, l'apparition des divers appareils reproducteurs, la sécrétion des pigments.

1° GERMINATION DES CONIDIES ET DES ASCOSPORES.

Il est pratiquement impossible d'obtenir une émulsion de conidies exempte d'ascospores et réciproquement. En fait, les émulsions que j'ai utilisées étaient très riches en conidies et pauvres en ascospores. Les faits que j'ai observés s'appliquent donc surtout aux conidies.

Les limites du *ph* entre lesquelles ces spores peuvent germer sont *ph* 2,6 à *ph* 8,4. La limite du côté acide peut être abaissée par la pré-

sence de composés toxiques, en particulier par des acides organiques à l'état moléculaire. J'ai le premier précisé, dans le cas des acides de la série acétique (p. 67) et de l'acide oxalique (p. 81), par quel mécanisme cette toxicité était liée à la concentration des ions H du milieu. Dans les travaux antérieurs, on a souvent signalé des limites variables suivant la nature des milieux, mais jusqu'ici aucune explication satisfaisante n'avait été donnée de ces irrégularités (1).

D'après ces résultats, l'*Aspergillus repens* est une espèce assez sensible à l'influence des ions H, puisque beaucoup d'espèces germent jusqu'à ph 1,7 [MEACHAM (110), BOYLE (25) etc.].

2° ZONES DE CROISSANCE OPTIMUM. INFLUENCE DU POINT ISO-ÉLECTRIQUE.

Dans la zone ph 2,6 à ph 8,4, il est difficile d'indiquer une région ou un point optimum. Cela dépend essentiellement de l'aliment azoté. On peut cependant dire qu'entre 2,6 et 3 du côté acide, 6 et 8,4 du côté alcalin, le développement est lent. Ces réserves faites, ce sont les milieux les plus alcalins qui donnent avec les sels ammoniacaux les meilleurs résultats, par suite de l'acidification inévitable qui suit leur assimilation. Avec les nitrates alcalins, ce sont au contraire les milieux les plus acides qui conviennent le mieux et pour des raisons du même ordre.

Avec des corps dont l'assimilation ne met pas en jeu des acides ou des bases forts, les courbes de croissance présentent un plateau entre ph 3,5 et ph 6 et dans quelques cas un minimum vers ph 5 ou ph 6, compris entre deux maximums. C'est notamment le cas du glycocolle et de l'asparagine, avec minimums respectifs 6,1 et 4,7, correspondant assez bien au point iso-électrique de ces ampholytes. La peptone, qui est un mélange, ne possède pas de point iso-électrique et ne présente pas non plus un tel minimum (pp. 136, 151).

HOPKINS 1922 (74) a déjà signalé des faits analogues. Il cultive *Gibberella Saubinetii* (Mout.) Saec., sur décoction de pomme de terre, ajustée à divers ph , par addition soit d'alcalis (KOH, NaOH), soit d'acides qui sont, suivant les cas, SO^4H^2 , $CH^3-CHOH-COOH$, soit le mélange de phosphates et d'acide phosphorique. Il obtient une courbe de croissance avec minimum bien défini, situé, suivant les cas, entre ph 5,5 et ph 6,3.

(1) JOACHIMOGLU (77) vient de montrer que l'action antiseptique du sublimé est maximum pour ph 5,5- ph 6,6 et diminue en milieu alcalin.

BRIGHTMAN, MEACHAM, AGREE (28) avaient trouvé des courbes analogues avec *Endothia paracitica*, quoique moins nettement. SALTER et MAC ILIVAIN (150), HIXON (72), OLSEN (126), COLE (42), ARRHENIUS (4), FISCHER (64), LLOYD (99) ont signalé des faits analogues dans la germination des plantes supérieures. COHEN et CLARK (40) figurent un double maximum pour le nombre de cellules de *Bacillus dysenteriae* en vie à la fin de la cinquième heure, sur milieux à *ph* variés.

Ces faits peuvent recevoir au moins deux explications :

1° Le protoplasme du mycélium est un ampholyte qui présente, comme tous les électrolytes amphotères, un point iso-électrique où toutes les propriétés passent par un minimum. Si le point iso-électrique est atteint, il y a coagulation du protoplasme, avec perte de toutes les propriétés vitales [WATERMAN (171), MICHAELIS (114), HARDY (71)]. Or ROBBINS (148) a récemment montré que le mycélium de *Rhizopus nigricans* Ehr. réagissait à l'égard des colorants comme un colloïde amphotère, de point iso-électrique 5,2, pour lequel les récoltes sont minimum.

2° Cette courbe à deux maximums a été obtenue en particulier avec les acides aminés et le minimum observé, variable suivant les cas, correspond assez bien à leur point iso-électrique. On ne le retrouve pas pour les corps qui ne possèdent pas de point iso-électrique défini comme la peptone. Mes résultats avec le glyocolle, l'asparagine et la peptone sont en faveur de cette dernière hypothèse (p. 137 et 151).

Les faits de cet ordre sont encore trop peu nombreux et entourés de trop de causes d'incertitudes pour permettre d'asseoir une théorie définitivement satisfaisante. On doit néanmoins les faire connaître, ne serait-ce que pour inciter à de nouvelles recherches.

En définitive, les courbes de croissance de l'*Aspergillus repens* sont de 4 types principaux, suivant l'aliment azoté offert :

- 1° Type nitrate, avec maximum du côté acide.
- 2° Type sel ammoniacal, avec maximum du côté alcalin.
- 3° Type peptone, avec maximum en plateau entre 3,5 et 6.
- 4° Type glyocolle, avec minimum compris entre deux maximums.

3° INFLUENCE DE LA RÉCOLTE SUR LES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES DU MYCÉLIUM.

Une des actions les plus curieuses des milieux acides sur les cellules mycéliennes est leur transformation en éléments renflés, pouvant

atteindre des dimensions énormes. Ce sont les cellules géantes. Ces singulières formations, découvertes par REES chez les *Mucors* (141), ont depuis fait l'objet de nombreuses recherches. Parmi les plus importantes, il faut signaler celles de KLEBS (83), sur *Mucor racemosus*. Cet auteur montra que la dissociation du mycélium et le renflement des cellules étaient produits à volonté, soit par l'action de solutions concentrées, soit par l'action de l'acide citrique. Mais ces formations ne sont pas spéciales aux Mucorinées et on les a observées dans d'autres groupes de champignons : *Cladosporium herbarum* [LAURENT (93)], *Aspergillus niger* et *flavus*, *Penicillium glaucum*, *Citromyces divers* [RITTER (145)], *Botrytis cinerea* [BEAUVÉRIE (9)], *Nectria cinnabarina* (Edde) Fres. [WERNER (177)], *Basidiobolus ranarum* Eidam, *Aspergillus penicilliopsis*, [RACIBORSKI (134)], *Aspergillus repens* [BACH (7)]. Leur apparition est liée, comme BEAUVÉRIE puis RITTER l'ont montré, à la présence des acides, soit que ceux-ci préexistent dans le milieu, soit qu'ils se forment au cours de l'assimilation des sels ammoniacaux. Ce dernier auteur a définitivement établi que les acides intervenaient par la concentration des ions H qu'ils peuvent fournir et que toute cause, capable de diminuer leur dissociation, empêchait l'apparition des cellules géantes.

WEHMER (174) décrit le même phénomène chez *Aspergillus fumigatus*, mais alors que RITTER expliquait ces formations par un trouble survenu dans les phénomènes de régulation de la pression osmotique, WEHMER pense que si la membrane n'offre plus la même résistance, c'est parce qu'elle a une composition chimique différente, comme si elle ne trouvait plus dans les milieux acides les constituants nécessaires.

On doit rapprocher de cette opinion l'observation de MOLLIARD (120). Les mêmes cellules géantes s'observent sur milieux privés de potassium et MOLLIARD ayant remarqué que les cendres de *Sterigmatocystis nigra* poussé sur milieu acide s'appauvrissaient en cet élément, n'hésite pas à conclure que l'acidité n'intervient ici que pour troubler l'assimilation du potassium.

Quoi qu'il en soit, ce phénomène est lié à la présence d'une certaine concentration des ions H, par suite au *ph*. La littérature scientifique ne donne aucune détermination à ce sujet. Mes expériences avec l'*Aspergillus repens* établissent nettement que les cellules géantes ne s'observent jamais dans les milieux à *ph* > 4. Entre *ph* 4 et *ph* 3, leur proportion augmente progressivement ; à partir de *ph* 3, on peut considérer que la culture entière est formée de telles cellules et que les conidies germent toutes directement en cellules

géantes. Un cas intéressant est celui de cultures développées normalement sur milieux à $ph > 4$ et amenées, par le jeu de l'assimilation des sels ammoniacaux, dans la zone $ph 3$. Le voile aérien formé de cellules pour la plupart vides de leur contenu et dont beaucoup ne sont plus en contact avec le liquide, ne subit pas de modifications. Mais les cellules jeunes, en voie d'organisation, prennent les caractères imposés par la réaction du milieu (p. 50).

Cette déformation morphologique peut être considérée comme une sorte de réactif des ions H. Les cultures obtenues en présence d'autres toxiques, quoique maigres et souffreteuses, ne présentent jamais ces déformations, à condition de ne pas se trouver dans la zone $ph < 4$. Inversement, des cultures vigoureuses obtenues, avec des sels ammoniacaux favorables, présentent ce stigmate, dès que la réaction favorable est réalisée.

4^o INFLUENCE DE LA RÉACTION SUR L'APPARITION DES DIFFÉRENTES FORMES D'APPAREILS REPRODUCTEURS.

C'est une notion aujourd'hui classique, depuis les travaux de TANRET (*l. c.*), que les milieux acides empêchent la formation des conidies chez l'*Aspergillus niger*. L'*Aspergillus repens* se comporte de même. Mais la disparition des conidiophores se fait progressivement ; on assiste de plus à une dégénérescence de tout l'appareil, qui a été particulièrement bien décrite par KLEBS (*l. c.*). Les conidiophores se rapetissent, se cloisonnent, les stérigmates diminuent de nombre et présentent, ainsi que les têtes, des déformations morphologiques rappelant les cellules géantes du mycélium. On observe des régressions fréquentes : une tête, un stérigmate, ou même une conidie reprenant les caractères d'une hyphe végétative. Enfin, si l'accumulation des ions H est suffisante, les conidiophores font complètement défaut.

En ce qui concerne les périthèces, les ébauches n'apparaissent pas dans les milieux plus acides que $ph 3,6-3,8$. Si le milieu est en voie d'acidification, les ébauches ne continuent pas leur évolution et peuvent subir les mêmes régressions que les conidiophores. Cependant, dans les voiles vigoureux, présentant un feutrage épais d'hyphes aériennes, sans contact avec le liquide, périthèces et conidiophores peuvent évoluer normalement, même sur milieux très acides. Les cultures sur sels ammoniacaux favorables et qui abordent la zone $ph 3$ avec un voile vigoureux, présentent des exemples particulièrement nets de cette anomalie apparente (p. 63 etc.).

D'ailleurs, on sait depuis les travaux de KLEBS et de MANGIN que dans le cas des *Aspergillus repens* et *glaucus*, c'est la pression osmotique qui règle principalement l'apparition des conidies. Celles-ci sont très abondantes sur milieux à pression osmotique peu élevée et sont pratiquement supprimées quand la concentration de NaCl atteint 10 à 15 %. La plupart des races cultivées par MANGIN ne donnent plus de conidies sur milieux à 20 % de glucose.

Dans les conditions où je me suis placé (5 % NaCl, 5 % de saccharose), l'apparition des conidies est très entravée, sans qu'il intervienne aucune action des ions H ; les voiles obtenus sur de bons aliments sont jaune d'or, avec de rares points verts. Il suffit de diminuer la proportion de NaCl pour obtenir des voiles complètement verts d'emblée. J'en ai cité des exemples quand j'ai étudié l'influence de la pression osmotique sur le rendement (p. 46).

Lorsque, dans les conditions habituelles, on observera une proportion élevée de conidiophores, on se trouvera en présence de substances, ou de conditions, exerçant une action favorable à leur égard. La réaction neutre ou alcaline est une de ces conditions et j'en ai donné dans mon travail des exemples particulièrement significatifs (p. 63, 88, 111).

On peut poser comme règle générale que, dans tous les milieux à *ph* initial plus grand que 6 et suffisamment stabilisés pour que la culture ne sorte pas très rapidement de cette zone, il apparaît d'abord des îlots couverts d'un gazon conidien vert qui se réunissent plus tard par une trame jaune dépourvue de conidies et correspondant aux parties organisées en milieu plus acide que *ph* 6. Dans les mêmes milieux, mais dont le *ph* initial est plus petit que 6, le voile est uniformément jaune.

Enfin, comme contre-partie, les cultures dépourvues de conidies et qui, par suite de raisons diverses, s'alcalinisent, se couvrent à ce moment de ces appareils. Cette apparition tardive a été observée par divers auteurs qui voyant concorder ce fait avec la disparition du sucre, ont établi une relation de cause à effet entre les deux phénomènes. En réalité, c'est la réaction qui joue ici encore le rôle déterminant. Ces faits mériteraient sans doute d'être reliés avec les observations de SAUTON (151), sur le rôle qu'exercent les éléments de la constante minérale sur l'apparition des conidies.

En définitive, l'apparition des conidies est à peu près suspendue dans les milieux très acides ; cette action est progressive et débute par des monstruosité morphologiques à partir de *ph* 4. De l'autre

côté de l'échelle des *ph*, une réaction neutre ou alcaline exerce une action stimulante spécifique sur cette forme de reproduction.

L'apparition des périthèces est complètement supprimée pour *ph* 3,6. Les milieux alcalins n'ont pas d'action favorisante.

5° INFLUENCE DE LA RÉACTION SUR LES PIGMENTS.

MANGIN a isolé d'une race d'*Aspergillus glaucus* un pigment peu soluble dans l'eau, très soluble dans l'alcool, qui est rouge orangé en milieu acide et violet en milieu alcalin. Ce pigment, qui lui a paru caractéristique de la forme *glaucus*, est distinct d'un autre pigment jaune fluorescent plus répandu.

L'*Aspergillus repens* que j'ai entre les mains sécrète ces deux pigments qui ne sont d'ailleurs abondants que dans les vieilles cultures. Le virage du pigment rouge orangé se produit avec une netteté particulière vers *ph* 6. La teinte obtenue est d'ailleurs plutôt brune que violette. Grâce à cette circonstance, on peut, sans aucune opération, connaître approximativement la réaction d'une culture.

DEUXIÈME PARTIE

CHANGEMENTS DE RÉACTION PRODUITS DANS LE MILIEU PAR L'UTILISATION DES DIVERSES FORMES DE L'AZOTE

La réaction d'une culture est l'objet de changements continuels : c'est un état d'équilibre entre les phénomènes d'acidification et d'alcalinisation dont l'intensité respective varie suivant l'âge, la nature et la dose des aliments etc. L'assimilation de l'azote sous ses différentes formes joue dans ces processus un rôle prépondérant, mais qui ne peut pourtant pas être étudié isolément, car les autres causes de modification de la réaction : assimilation du sucre, protéolyse etc., exercent une influence impossible à négliger.

Chaque organisme présente-t-il une réaction limite, réalisée invariablement sur tous les milieux et représentant une sorte de caractère spécifique ? Sous cette forme générale, cette notion serait certainement inexacte. La réaction limite d'une culture n'est pas due à ce qu'on pourrait appeler une sorte de choix du végétal, capable de régulariser à volonté son milieu ; elle est la résultante de réactions déterminées par les conditions physico-chimiques de la culture et aussi inévitables que celles que nous réalisons *in vitro*. Parfois ces réactions semblent être convergentes et amènent le milieu vers une valeur moyenne que l'on pourrait prendre pour un optimum, ce qui serait une illusion. Car, dans d'autres cas, le milieu est aussi bien amené dans des régions nettement dysgénésiques, sans que le végétal puisse lutter contre cette variation. Ces phénomènes ne sont pas spéciaux aux champignons. CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN 1924 (39), SIERAKOWSKI 1923 (157) les ont signalés chez les bactéries.

A. PHÉNOMÈNES D'ACIDIFICATION

L'assimilation des sels ammoniacaux s'accompagne fatalement de la mise en liberté de l'acide uni à l'alcali. S'agit-il d'acides minéraux forts, il y a production de corps comme HCl , SO_4H^2 , très dis-

sociés, qui provoquent une ascension très rapide de la concentration hydrogène. L'*Aspergillus repens* arrive ainsi aux chiffres *ph* 2 à *ph* 1,7. On a signalé des chiffres sensiblement plus élevés : 1,56 avec l'*Aspergillus fumigatus* [BOAS et LEBERLE (21)], 1,4 avec l'*Aspergillus niger* [(CURRIE (44)]. Cette réaction est d'ailleurs connue depuis longtemps et son intensité est telle qu'elle masque toutes les autres, mais il manquait jusqu'ici de preuves précises que la quantité d'acide minéral libéré dans la consommation du sel ammoniacal était capable de réaliser *in vitro* le même phénomène. J'ai administré cette preuve dans le cas de l'*Aspergillus repens*. Cette démonstration a été possible, dans ce cas particulier, grâce à quelques circonstances favorables. L'acide libéré n'est pas neutralisé par le jeu de la protéolyse, qui ne s'exerce pas dans cette région des *ph* ; il n'est pas susceptible d'être repris par le végétal, du moins en quantités appréciables ; enfin et surtout, il n'y a pas production simultanée d'acides organiques à partir du sucre qui viendraient troubler, par leur pouvoir tampon, la corrélation qui existe entre l'acidité potentielle et l'acidité actuelle.

Ces circonstances ne sont plus réalisées dans le cas de PO_4H^3 et surtout des acides organiques. Ici l'acide est plus ou moins vite et énergiquement consumé par le champignon, d'où résulte une cause d'alcalinisation et une diminution du pouvoir tampon. Il peut aussi intervenir, dans la zone des *ph* où l'on se trouve, soit une autolyse du mycélium avec production d'ammoniaque, soit une production d'acides comme l'acide oxalique.

Il n'y a donc plus de corrélation possible entre l'acidité actuelle et l'acidité de titrage. De plus, la phase d'acidification initiale fait place plus ou moins vite à un changement de réaction, où la consommation des molécules acides joue le principal rôle.

Comme le champignon consomme de préférence le saccharose et ne s'attaque à la molécule organique des acides qu'une fois le sucre disparu, c'est en définitive la dose de sucre qui règle le *ph* limite. Les chiffres que j'ai donnés pour le succinate d'ammoniaque, en présence de doses croissantes de sucre, sont très démonstratifs à cet égard (p. 94).

Les acides organiques dont la molécule est inassimilable (a. oxalique, a. mucique) produiront, toutes choses égales d'ailleurs, une acidification plus durable et qui sera permanente. A l'opposé, les acides de la série acétique sont consommés d'emblée par le champignon, d'où résulte, comme premier phénomène visible, une alcalinisation aux lieu et place de l'acidification habituelle.

L'influence de la consommation des acides aminés est plus difficile à analyser. D'après la théorie de CZAPEK, ces corps seraient absorbés directement et à l'état de molécules et comme il s'agit d'ampholytes, il ne doit en résulter aucun changement de réaction. Mais la théorie de CZAPEK n'est guère plus soutenable, depuis notamment les travaux d'EHRlich et de ses collaborateurs. La désamination préalable implique la mise en liberté d'un acide alcool, c'est-à-dire une acidification. En réalité, celle-ci est faible, car les acides ainsi engendrés sont des acides peu dissociés et sans doute sont-ils eux-mêmes rapidement attaqués par le champignon. La tyrosine, qui met en liberté un acide inutilisable pour l'*Aspergillus*, donne les milieux les plus acides et sans régression ultérieure. J'ai observé en outre dans tous les cas une augmentation du pouvoir tampon. L'apparition simultanée d'acide oxalique semble enlever de sa valeur à cette preuve indirecte de l'apparition d'acides véritables aux dépens des amino-acides. Il n'en est rien, car le pouvoir tampon de l'acide oxalique ne s'exerce guère qu'au-dessus de *ph* 5, et ne saurait être rendu entièrement responsable de cette variation.

Quant à l'assimilation des amides, nos connaissances sont encore peu précises à ce sujet. Boas (17) a observé que l'*Aspergillus niger* assimile l'acétamide en acidifiant la culture. Je suis arrivé à des conclusions analogues, ce qui semble indiquer une hydratation en sel ammoniacal, avec mise en liberté ultérieure de l'acide correspondant.

Le cas de l'urée est théoriquement analogue. La présence d'une uréase chez les champignons filamenteux a été démontrée depuis longtemps par SHIBATA (*l. c.*). On pourrait donc s'attendre à une alcalinisation précoce. Ce n'est pas toujours le cas, à cause de la production d'acide oxalique dans les milieux à *ph* inférieur à 5, d'où peut résulter, comme dans le cas des nitrates, une acidification initiale.

L'assimilation de la peptone en présence de sucre, dans des conditions où elle ne sert que d'aliment azoté, se traduit par les mêmes réactions que celle des amino-acides : le milieu s'acidifie d'abord légèrement, puis s'alcalinise.

Influence de la nutrition carbonée.

La consommation du sucre est une des causes les plus habituelles de l'acidification. Le sucre, aliment énergétique, est brûlé au cours

de l'acte respiratoire et le terme final de la combustion est CO^2 . La présence de celui-ci, en solution dans le liquide de culture, peut suffire pour produire une variation du *ph* appréciable. Ce serait d'ailleurs une erreur de faire les déterminations du *ph* après expulsion de CO^2 , puisque, ce faisant, on modifierait la réaction réalisée par le végétal. C'est une erreur du même ordre que l'on commettrait en prenant le *ph* du sang après expulsion de CO^2 . Mais dans les conditions habituelles de culture, dans des vases communiquant largement avec l'air, le rôle de CO^2 est secondaire.

En fait, la plupart des champignons expérimentés ont décelé une acidification plus ou moins intense, due à des acides organiques fixes et d'ailleurs variable suivant la nature du sucre [BOAS et LEBERLE (22)]. Ces acides organiques, dont la formation chez les végétaux supérieurs se traduit par un quotient respiratoire inférieur à l'unité, correspondent à une combustion incomplète du sucre. Il n'est pas douteux qu'il en est de même chez les moisissures. Les acides les plus couramment isolés sont l'acide oxalique, l'acide citrique, l'acide succinique [GOUPILO (69)] et récemment l'acide gluconique. Les belles recherches de MOLLIARD (115, 116, 117, 118, 119) sur l'*Aspergillus niger* ont montré que leur apparition était liée avant tout à la composition de l'aliment minéral et qu'avec des milieux déséquilibrés, on pouvait à volonté produire tel ou tel d'entre eux. Ces corps apparaissent ainsi comme des étapes dans la combustion du sucre, étapes qui normalement sont insaisissables.

Mais en dehors de ces conditions spéciales, les moisissures produisent de l'acide oxalique toutes les fois que le milieu a tendance à devenir alcalin et dans ce cas seulement. Ainsi il ne s'en forme pas en présence des sels ammoniacaux, alors que son apparition est précoce dans le cas de NO^4K , pour combattre l'accumulation de KOH . Sur les autres sources d'azote, il apparaît généralement en période d'autolyse.

Ces notions, aujourd'hui classiques, font prévoir que la formation d'acide oxalique est sous la dépendance de la réaction du milieu. Il doit y avoir une zone des *ph* où cet acide ne se forme plus, une autre zone où il apparaît constamment, mais jusqu'à ce jour aucune recherche n'a été faite pour préciser ce point.

Mes recherches ont d'abord montré que l'acide oxalique était un produit du métabolisme de l'*Aspergillus repens* et qu'il avait la même signification physiologique que chez les autres moisissures. Elles ont ensuite précisé les conditions de réaction qui président à sa formation.

Le cas du nitrate de potassium est le plus caractéristique : c'est entre *ph* 5 et *ph* 4 que l'acide oxalique cesse de se montrer. Cette circonstance explique que, quelle que soit la réaction initiale, les milieux convergent tous vers cette zone des *ph*. L'acide oxalique est d'ailleurs d'autant plus abondant que le milieu est plus alcalin et que la culture est plus développée (Fig. 15, p. 113).

Le sucre a souvent totalement disparu à ce moment ; l'acide oxalique de neutralisation n'apparaît donc pas comme un produit intermédiaire de la combustion du sucre ; il semble plutôt qu'on a affaire à une sorte de produit de déchet, tout comme pour l'ammoniaque issue de la protéolyse. Ainsi les milieux à la peptone, sans addition de sucre, sont ceux qui donnent le plus d'acide oxalique (Tabl. 94, p. 149). Ceci est conforme à l'opinion de MAZÉ (109), au sujet de l'acide citrique, et d'ELFING (60), pour l'acide oxalique.

Enfin les notions que nous devons à EMMERLING (62), sur la nature des corps susceptibles de donner de l'acide oxalique, sont à reviser en partie pour y faire entrer cette conception plus large de l'influence de la réaction.

B. PHÉNOMÈNES D'ALCALINISATION DES CULTURES

L'alcalinisation des cultures relève de causes plus nombreuses et plus complexes encore que l'acidification. Elle aboutit d'ailleurs rarement à une réaction franchement alcaline, à cause de la production empêchante d'acide oxalique.

La nutrition azotée ne joue un rôle que dans quelques cas déterminés, en particulier au cours l'assimilation de l'ion nitrique, de l'urée ou de la peptone.

Cas particulier des nitrates, de l'urée, de la peptone.

Dans le cas de l'ion nitrique, il y a mise en liberté de bases fortes : NaOH, ou KOH, par exemple et qui, d'ailleurs, sous l'influence de CO₂, passent à l'état de carbonates ou de bicarbonates.

Pour l'urée, il y a transformation du produit en carbonate d'ammoniaque sous l'influence d'une uréase. Mais, dans les deux cas, l'alcalinisation peut être masquée par la formation d'acide oxalique. Les espèces qui ne donnent pas d'acide oxalique s'alcalinisent toujours beaucoup plus fortement. Cependant, même avec l'*Aspergillus niger*, dont on connaît les propriétés acidifiantes énergiques, Boas (18)

a vu l'urée donner un milieu si alcalin que le champignon ne tarde pas à mourir.

La peptone n'alcalinise qu'en l'absence de toute autre source de carbone. Dans ce cas, les amino-acides issus de son hydrolyse ont leur chaîne carbonée utilisée en plus grande proportion que leur azote qui s'accumule à l'état d'ammoniaque. Les acides aminés, employés isolément comme source de carbone et d'azote, se comportent de même. Ainsi MOORE (122) a observé avec *Fusarium cæruleum*, que l'asparagine, en présence de beaucoup de sucre, conduisait à une acidification, tandis que le milieu s'alcalinise s'il n'y a que peu de sucre. J'ai observé des faits analogues avec l'asparagine.

Mais ce ne sont là que des cas particuliers : les deux causes les plus générales d'alcalinisation des cultures résident dans la consommation des molécules acides préexistantes, ou issues de la combustion incomplète du sucre et dans l'ammoniaque issue de la protéolyse.

Production de bases organiques.

Certains auteurs invoquent en outre l'apparition de substances alcalines, sous forme de bases organiques, qui n'ont d'ailleurs pas été isolées avec précision. HOWARD REED et GRISSOM (140) signalent ainsi que les cultures de *Glomerella rufomaculans* (Berk.) Spaul. et von Schrenk, renferment des bases hexoniques : *lysine* et *histidine*, ou puriques : *xanthine* et *hypoxanthine*. Mais outre que beaucoup de ces corps sont neutres, leur intervention dans les phénomènes d'alcalinisation ne peut être que secondaire, par suite des faibles quantités mises en jeu.

Consommation des molécules acides.

La consommation des acides organiques est certainement la cause prédominante. Elle est connue depuis longtemps : ainsi RITTER (144), pour obtenir des cultures à réaction alcaline (*Mucor racemosus*, *Cladosporium herbarum*), remplace le sucre par du malate ou du succinate de soude. WEHMER (173), NIKITINSKY (*l. c.*), KIESEL, BRENNER ont signalé de nombreux faits analogues.

Mais c'est à AYERS et RUFF (6) que nous devons l'analyse la plus précise du phénomène. Les bactéries du groupe du *B. ærogenes* font fermenter énergiquement le dextrose en le transformant partiellement en acides organiques, parmi lesquels les auteurs ont caractérisé et dosé l'acide formique. La réaction passe ainsi de *ph* 7.5

à *ph* 5,3, puis le formiate est attaqué à son tour, ce qui se traduit par une régression rapide du *ph* qui revient vers 7. En présence d'un mélange *Dextrose + formiate*, ou *dextrose + citrate de soude*, l'acidification initiale est peu intense ; elle est suivie d'une alcalinisation profonde due à la consommation des radicaux organiques acides.

CLARK et LUBS (38) confirment ces résultats dont ils font ressortir le grand caractère de généralité. Les bases, qui étaient unies aux acides organiques, ne passent pas à l'état de bases libres, mais de carbonates ou de bicarbonates alcalins, soit par dégradation directe, soit par action secondaire de CO_2 , toujours présent dans les cultures. Nous avons vu plus haut que BOYLE et PRATT retrouvent ces corps et leur font jouer un rôle essentiel dans la toxicité des vieilles cultures de *Fusarium*.

J'ai donné des exemples très nombreux de ces processus. Jusqu'ici ces notions n'avaient pas été développées chez les champignons avec la notation actuelle de l'acidité.

Les acides organiques étudiés se comportent de façon assez différente. Les uns, comme ceux de la série acétique, sont attaqués de façon très précoce, quelle que soit la dose de sucre et le stade de la culture, d'où résulte une alcalinisation initiale qui est le premier changement de réaction décelable. J'ai donné une explication de cette véritable anomalie, en indiquant que ces faits sont liés à la propriété de ces corps d'être solubles dans les lipoides et de passer directement à ce titre dans la cellule (p. 75). Mais la plupart des acides ne sont attaqués que lorsque la majeure partie du sucre est consommée ; la réaction revient alors dans la zone *ph* 6 à *ph* 7. En suivant les variations du pouvoir tampon et les relations entre l'ammoniaque disparue et l'acidité de titrage, on peut, avec une précision suffisante, déceler le début, puis l'amplitude de ce phénomène. Certains corps, comme l'acide malique (p. 101), sont attaqués de façon précoce et cette circonstance aboutit au résultat paradoxal, en apparence, d'une moins bonne utilisation. En effet, la culture est ramenée, dès le début, dans la zone neutre où la croissance est peu active. D'autres, comme l'acide oxalique (p. 103), ou l'acide mucique (p. 85), sont à peu près inattaquables, d'où résulte que le pouvoir tampon des cultures ne diminue pas et que le *ph* ne subit pas de régressions de grande amplitude.

La molécule des amino-acides, ou des acides alcools issus de la désamination, une fois le sucre totalement ou partiellement consommé, peut subir la même attaque, d'où résulte ici la libération d'une quantité plus ou moins grande d'ammoniaque. Cela se traduit

par une alcalinisation que l'on n'observe pas avec la tyrosine, par exemple, fait dû sans doute au peu de valeur alimentaire du tyrosol, issu de la désamination de ce corps.

L'utilisation de la peptone, se faisant après hydrolyse, donne lieu aux mêmes phénomènes.

*Influence de la protéolyse
sur l'alcalinisation des cultures.*

C'est un des phénomènes les plus remarquables des cultures de champignons de voir, une fois l'aliment énergétique consommé, le mycélium continuer à vivre aux dépens de sa propre substance. Cela se traduit par des phénomènes très objectifs : le voile cohérent, vigoureux, devient friable, vert sale, le liquide se colore fortement et le poids de la récolte diminue beaucoup. Simultanément on observe une augmentation de l'ammoniaque présente dans le milieu de culture et une diminution du pourcentage de l'azote total du mycélium. On assiste en effet à une véritable digestion de la substance mycélienne et, comme la consommation du carbone, au cours de l'acte respiratoire, l'emporte de beaucoup sur celle de l'azote, ce dernier corps s'accumule sous forme d'ammoniaque.

Cette protéolyse est l'œuvre de ferments étudiés d'abord par MALFITANO (*l. c.*), SHIBATA (*l. c.*) et plus récemment par DERNBY (47) chez la levure. L'autolyse est ici l'œuvre de diastases protéolytiques, analogues à celles qui existent dans la série animale :

une pepsine à *ph* optimum = à 4,5

une trypsine » » » 7

une ereptase » » » 7,8

L'action de ces ferments aboutit à un mélange de polypeptides et d'acides aminés qui ne donneront l'ammoniaque caractéristique des phénomènes d'autolyse que sous l'influence d'un autre ferment, une désamidase, à *ph* optimum égal à 6. La désamidase de DERNBY est d'ailleurs inactive sur la plupart des acides aminés et n'enlève à l'asparagine que 50 % de son azote. Il doit donc intervenir d'autres ferments, sans quoi l'azote aminé augmenterait au cours de l'autolyse, ce qui est en contradiction avec tout ce que nous savons et notamment avec les observations de KLOTZ (*l. c.*).

Je n'ai pas cherché à isoler les ferments qui interviennent dans ces processus, mais j'ai pu apporter quelques précisions sur les conditions de réaction dans lesquelles ils agissent.

Lorsque la réaction est très acide (*ph* 2), la protéolyse est nulle,

ou du moins ne se traduit par aucun phénomène objectif ; la zone la plus favorable commence à *ph* 5 ; cependant, dans la région 4 à 5, j'ai vu les récoltes sur mucate ou phosphate d'ammoniaque diminuer légèrement de poids, cependant que l'ammoniaque résiduelle augmente légèrement. En définitive, la protéolyse peut s'exercer dans une zone très étendue de l'échelle des *ph*, ce qui est conforme aux observations de DERNBY, mais elle est maximum dans la zone neutre ou alcaline.

L'intensité de la protéolyse peut se traduire, soit par la diminution du poids de la récolte, soit par l'augmentation de l'ammoniaque présente dans le milieu (1). Ce sont des moyens d'évaluation assez grossiers : les processus d'autolyse commencent de très bonne heure et n'arrivent à l'emporter sur les phénomènes d'édification des tissus que lorsque ceux-ci sont arrêtés par épuisement du milieu. On n'a donc que la résultante de ces deux actions et au moment où la deuxième l'emporte.

La perte de poids, évaluée par la différence entre les deux chiffres extrêmes, est en moyenne de 20 à 30 % de la récolte maximum. Elle est d'ailleurs réalisée en quelques jours et les cultures conservées 30 jours et plus ne présentent plus de diminution sensible à partir du 20^e. A ce moment, le carbone et l'azote présents dans le mycélium sont sous une forme absolument impropre à tout métabolisme vital [DOX et MAYNARD (50)].

En ce qui concerne l'ammoniaque, son augmentation peut atteindre, chez les sels ammoniacaux, 1/7 de l'azote offert. Les chiffres sont d'ailleurs d'autant plus élevés que la récolte est plus considérable. Ces quantités sont suffisantes pour produire une certaine augmentation du *ph*, mais qui est de faible importance quand on la compare à celle qui est le fait de la consommation des radicaux acides.

Un moyen, peut-être plus précis, d'étude de la protéolyse, est de suivre les variations de l'azote total du mycélium. C'est un fait connu depuis longtemps que son pourcentage diminue avec l'âge. Mais on n'a pas jusqu'ici fait suffisamment état de la réaction du milieu sur lequel le champignon végète. Mes résultats montrent que

(1) Chez les bactéries, DE BORD (24) admet au contraire comme indice plus représentatif de la protéolyse, l'azote aminé. Mais il trouve que la présence de doses élevées de glucose favorise la production de N aminé. Or, l'effet le plus certain de la présence du glucose est d'acidifier le milieu et il est probable que dans ces conditions les protéases microbiennes ne sont pas à même d'aller jusqu'au bout de leur action : l'ammoniaque.

le taux de l'azote total est très élevé : 8 à 9 % au début de toutes les cultures et se maintient à ce niveau, si par suite d'une acidité élevée, le champignon ne peut poursuivre son évolution normale. Dans les conditions habituelles, le taux initial baisse jusqu'aux environs de 5 à 6 % et s'y maintient tant qu'il reste du sucre, c'est-à-dire tant que la protéolyse n'intervient pas activement. Celle-ci peut faire baisser le taux de N total jusqu'à 4 %.

C'est ainsi qu'on peut interpréter les chiffres obtenus avec le phosphate d'ammoniaque.

TABLEAU 98

Age	0	4	5	6	8	10	12	14	16	18	20
Série 20 $\left\{ \begin{array}{l} \text{PH} \\ \text{N \%} \end{array} \right.$	4	3,4 8,8	3,1 8,35	2,9	2,9 9,05	2,9 8,35	2,9 8,30	2,9 8,3	2,9 8,2	2,9 8,25	2,9
Série 22 $\left\{ \begin{array}{l} \text{PH} \\ \text{N \%} \end{array} \right.$	7		6,5 7,06	6,1 6,95	5,3 5,75	4,8 5,61	5,4 5,70	5,6 4,42	5,8 4,48	5,6 4,23	5,6 4

Il restait encore du sucre à la fin de la première expérience ; dans la deuxième, il avait disparu entre le 16^e et le 18^e jour.

Avec le chlorhydrate d'ammoniaque en présence de citrate de soude (voir tableaux 8, 9 et 10, page 54), on obtient de même :

TABLEAU 99

Age	0	6	8	10	12	14	16	18	20
Série 8 $\left\{ \begin{array}{l} \text{PH} \\ \text{N \%} \end{array} \right.$	3,6	2,2 6,80					2,4 6,83	2,4 7,30	
Série 9 $\left\{ \begin{array}{l} \text{PH} \\ \text{N \%} \end{array} \right.$	5	2,8 6,43	2,7 5,33	3,2 5,30	2,5 5,16	2,5 5,05	2,5 5,27	2,5 5,50	3,2 5,52
Série 10 $\left\{ \begin{array}{l} \text{PH} \\ \text{N \%} \end{array} \right.$	8	6,2 7,96		4,9 5,35	4,6 5,04	4,5 4,37	4,5 5,31	4,5 4,91	4,4 5,10

Le sulfate d'ammoniaque se comporte de même (Séries 17).

TABLEAU 100

Age		0	6	8	10
Série 17 a	PH N %	3,6	2,2 9,65	2,1 8,79	2 7,20
Série 17 b	PH N %	5	2,8 6,23	3,9 5,10	3,6 5,35
Série 17 c	PH N %	8	6,2 8,27	3,6 5,80	3 5,92

Ces résultats s'expliquent facilement quand on se rappelle l'aspect cytologique d'un voile de Mucédinée. Dans les tout premiers jours de la culture, le voile est formé uniquement de cellules à protoplasme granuleux, remplissant toute la cavité cellulaire. A ce stade, correspondent des teneurs en azote élevées, mais très rapidement, le voile n'est plus formé que d'un feutrage de cellules mortes, vides de leur contenu, et réduites à leur membrane, avec seulement quelques filaments en voie de croissance présentant l'aspect primitif. La proportion des parties cellulosesiques, pauvres en azote, augmente donc très vite et c'est là qu'il faut voir la cause de cette première diminution de l'azote total. Mais nous sommes là en présence d'un premier processus de protéolyse, décelé par le microscope et qui a débuté bien plus tôt qu'on ne peut le découvrir par des examens purement chimiques. Dans les milieux très acides, où l'évolution du champignon est suspendue, et où la culture est formée de cellules géantes dont le contenu cellulaire l'emporte de beaucoup sur la membrane, on doit s'attendre à un taux élevé en azote.

Sous réserve de ces observations qui n'avaient jamais été formulées, mes résultats confirment ceux de TERROINE, WURMSER et MONTANE (164), qui sont jusqu'à présent les plus complets que nous possédions sur les variations de l'azote total des cultures de Mucédinées.

TROISIÈME PARTIE

VALEUR ALIMENTAIRE DES DIVERSES FORMES DE L'AZOTE POUR L' « ASPERGILLUS REPENS »

Pour terminer, il nous reste à examiner la valeur alimentaire des diverses formes de l'azote pour l'*Aspergillus repens*. Les micro-organismes, surtout les Mucédinées, ont à un très haut degré la faculté de s'adapter à des conditions de vie : température, pression osmotique, acidité, les plus diverses. Elles peuvent de même prendre leur aliment aux combinaisons les plus variées et les plus dissimilaires. Cette faculté d'adaptation n'est pas lente, progressive, mais se manifeste d'emblée et cependant ces phénomènes ne s'accompagnent pas d'un changement dans la composition de leurs tissus. Comme les êtres supérieurs, les Mucédinées maintiennent, dans les conditions les plus variées, la fixité de leur milieu intérieur. Cela a surtout été démontré pour les matières protéiques [ABDERHALDEN et RONA (L. c.)].

Comme la détermination des protides des tissus est une opération longue et délicate, on se contente le plus souvent pour cette démonstration d'une approximation grossière : le taux de l'azote total, VORBRODT (168), TERROINE, WURMSER et MONTANE (164) ont ainsi montré que le taux de cet élément diminuait suivant qu'on se trouvait au début de la culture, en période d'état ou au moment de la dégénérescence, mais que, ces réserves faites, il était à peu près indépendant de la nature de l'aliment. Or ces réserves elles-mêmes, comme je l'ai indiqué, n'ont qu'une valeur relative, car elles tiennent à une différence de répartition et non de composition des protides des tissus. Par suite, la fixité de composition est encore plus grande qu'il ne ressort de ces expériences.

Le microorganisme peut donc, dans tous les cas, édifier la même molécule azotée. On est ainsi conduit invinciblement à penser que toutes les formes de l'azote sont utilisées de la même façon, après avoir été au préalable transformées, par une véritable digestion, en un corps identique dans tous les cas et qui est le point de départ de la synthèse protéique.

A ce sujet, deux théories au moins : ammoniacque ou amino-acide, sont en présence.

1° L'AMINO-ACIDE,
FORME OBLIGATOIRE DE L'ASSIMILATION DE L'AZOTE.

C'est la théorie de CZAPEK, à laquelle nous avons déjà fait souvent allusion. Les travaux de FISCHER ayant montré que les protides sont formés d'une réunion d'amino-acides enchaînés suivant le mode peptidique, CZAPEK pense qu'en offrant à l'organisme une ou plusieurs de ces molécules élémentaires, on le met dans les meilleures conditions pour effectuer la construction totale. Les autres formes de l'azote ne sont absorbables qu'après leur transformation en acide aminé et c'est la facilité plus ou moins grande de cette transformation qui règle leur valeur alimentaire.

CZAPEK explique ainsi les résultats de ses observations :

1° De tous les corps étudiés, les amino-acides fournissent les résultats les plus favorables.

2° Les sels ammoniacaux des oxy-acides, qui fournissent des résultats du même ordre, le doivent à leur facile transformation en amino-acide.

3° Les sels ammoniacaux des acides minéraux $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, NH_4Cl , ou des acides gras, dont on ne voit pas la transformation facile en acide aminé, sont en fait inassimilables.

4° Les autres formes de l'azote : nitrates, amines, amides, etc., s'établissent plus ou moins derrière les corps du premier groupe.

Les travaux de PURIEWITSCH (*l. c.*), sur la perte d'énergie qui accompagne l'assimilation des divers corps azotés, ont apporté une confirmation des idées de CZAPEK. Le rapport $\frac{\text{CO}_2}{\text{Récolte}}$ est inférieur à l'unité pour la plupart des acides aminés, l'urée, l'acétamide et la dépasse pour le mélange Sulfate + phosphate d'ammoniaque, pour les nitrates et, fait inattendu, pour la peptone.

BRENNER, KLOTZ rapportent les expériences de CZAPEK et tout en faisant des réserves sur la méthode suivie, approuvent ses conclusions dans ses grandes lignes et sans apporter de faits nouveaux.

On doit à BOAS (15) une critique très serrée de la technique et des conclusions de CZAPEK : dose insuffisante de sucre, durée trop longue des expériences amenant un remaniement des cultures par protéolyse, influence nuisible de l'acidité complètement passée sous silence, etc.

Pour BOAS, la thèse de CZAPEK ne repose sur aucune base expérimentale solide. Les résultats de PURIEWITSCH eux-mêmes ne prouvent rien en sa faveur, car si les amino-acides ont un coefficient inférieur à celui des sels ammoniacaux, la peptone, réunion de tous les amino-acides, a un coefficient supérieur et l'on n'a pas expérimenté avec des corps comme les sels d'oxy-acides.

Enfin, d'une façon constante, les sels ammoniacaux ont donné, entre d'autres mains, des résultats égaux, sinon supérieurs à ceux des amino-acides.

Au point de vue théorique, la thèse de CZAPEK ne soulève pas moins de difficultés. Sans doute, il est possible que l'acide aminé employé soit absorbé directement, pour la part qui lui revient dans la molécule protéique. Cela ne représente, dans les cas les plus favorables, qu'une faible portion des besoins en azote. La synthèse ne sera possible que si tous les autres matériaux sont présents, à pied d'œuvre, en quelque sorte. Il faudra donc que l'organisme, avec l'acide aminé qui lui est offert, fasse la synthèse de tous les autres. Cette synthèse, par transformation directe, est pour le moins invraisemblable. On ne voit pas bien, par exemple, par quel chemin l'organisme passera de la glycine à la leucine, à la tyrosine, au tryptophane ou à la proline et réciproquement.

Nous avons admis jusqu'ici, et c'est l'hypothèse la plus favorable à l'idée de CZAPEK, que les protides sont uniquement formés d'un enchaînement bout à bout de molécules d'acides aminés. Les données modernes sur la constitution de la matière protéique sont bien moins exclusives et si les acides aminés sont bien les produits constants et prépondérants de l'hydrolyse, bien d'autres modes d'assemblage que la liaison peptidique de FISCHER sont à envisager. Ces modes de liaison, pas plus d'ailleurs que celui découvert par FISCHER, n'impliquent l'utilisation d'acides aminés préformés, mais plutôt leur construction, fonction par fonction, à l'aide de matériaux plus simples.

En résumé, si l'organisme est capable, comme l'expérience le vérifie, de faire avec un seul amino-acide la synthèse de toute sa molécule protéique, il ne peut le faire qu'après avoir pris à ce corps son radical azoté qui, copulé à des résidus carbonés divers, servira de matériel élémentaire à la construction de tout l'édifice. La forme la plus vraisemblable de ce radical azoté est la forme ammoniacale.

2° L'AMMONIAQUE,
FORME OBLIGATOIRE DE L'ASSIMILATION DE L'AZOTE.

C'est l'ancienne théorie de DUCLAUX (49), de LÆW (101) et de NÆGELI (123), à laquelle KOSTYTCHÉW (*l. c.*), EHRLICH (*l. c.*) et d'autres ont apporté des arguments particulièrement forts. Dans cette hypothèse, on ne nie pas l'intervention des amino-acides dans la synthèse protéique, et peut-être même les fait-on intervenir avec trop de complaisance, mais au lieu d'en faire le point de départ obligatoire, on ne les considère plus que comme un terme de passage, plus ou moins facultatif ou fugace.

Toutes les formes de l'azote, les amino-acides compris, sont d'abord transformées en ammoniacque et celle-ci, copulée aux résidus carbonés, issus principalement de la rupture de la molécule sucrée, conduit aux protides, par l'intermédiaire probable, mais non constamment obligatoire, des acides aminés.

Cette théorie rend compte d'une façon théoriquement satisfaisante du début de la synthèse. Il reste à voir si elle est d'accord avec les faits. Le rôle prééminent de l'ammoniacque doit se traduire par divers phénomènes :

Supériorité des récoltes obtenues sur les sels ammoniacaux ;

Consommation par préférence de l'azote ammoniacal dans un mélange de plusieurs formes ;

Transformation préalable de toutes les autres combinaisons azotées en ammoniacque ;

Ces preuves, directes et indirectes, de valeur inégale, méritent d'être passées en revue.

1) *Supériorité des récoltes obtenues sur les sels ammoniacaux.*

Trop de causes secondaires, où la variation de la réaction joue d'ailleurs le principal rôle, peuvent modifier le rendement d'une culture, pour que les chiffres ainsi obtenus aient une valeur absolue. Bien des erreurs ont été commises en voulant classer les corps d'après ce seul critérium. Cependant, ces réserves faites, l'inspection des résultats obtenus avec l'*Aspergillus repens* montre une supériorité évidente des sels ammoniacaux : nuls autres corps ne permettent une culture aussi rapide et aussi intense que, par exemple, les sels des acides bibasiques ou des acides alcools. Les résultats inférieurs, obtenus dans des cas déterminés, ont obtenu une explication satisfaisante.

L'ion ammoniacal a dans tous les cas la même valeur alimentaire, mais la culture peut être gênée secondairement par l'influence nuisible,

soit du cation [cas de NH_4Br , cité par COHN et CZAPEK (41)] ;

soit de la molécule non dissociée (cas des acides gras) ;

soit de l'ion H qui se forme dans la dissociation de l'acide libéré par la consommation de l'ammoniaque des sels d'acides forts.

2) Consommation par préférence de l'ion ammoniacal dans un mélange.

Dans cet ordre d'idées, où la voie a été ouverte par les travaux de PFEFFER (130), des résultats particulièrement instructifs ont été obtenus par ZALEWSKI et ISRAILSKY (180) et ZALEWSKI et PJUKOW (181). L'*Aspergillus niger* a été cultivé sur des mélanges de sulfate d'ammoniaque et de divers corps azotés. Après culture, on compare la consommation respective de l'ammoniaque et du corps qui l'accompagne, ce dernier étant dosé de façon conventionnelle par la différence entre l'azote total et l'azote ammoniacal résiduels. On obtient ainsi les rapports :

$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)^2$	+ histidine	100/0
id.	+ phénylalanine	100/8
id.	+ peptone de Witte	100/17,8
id.	+ leucine	100/24,2
id.	+ glycocolle	100/54,5
id.	+ alanine	100/70,3
id.	+ ac. aspartique	100/73,5
id.	+ mélange d'acides aminés	100/150
id.	+ autolysat de levure	100/152

Ces deux derniers résultats n'infirmement d'ailleurs pas la supériorité habituelle des sels ammoniacaux. Car ici on a affaire à l'ensemble des acides aminés nécessaires à la synthèse.

BOAS et LEBERLE (23) ont apporté des faits plus suggestifs encore et avec une méthode plus simple. Se basant sur l'acidification très élevée qui accompagne la consommation du sulfate d'ammoniaque, ils suivent la variation du *ph* dans des cultures sur :

$\text{SO}_4 (\text{NH}_4)^2$	seul
id.	+ acétamide
id.	+ peptone

et obtiennent des courbes identiques dans tous les cas. Malgré les

conditions défavorables créées par la consommation de l'ion ammoniacal, l'organisme ne s'attaque qu'à lui. Il est donc incapable de faire un choix qui lui permette de régulariser sa réaction.

J'ai répété les expériences de BOAS et LEBERLE et sur les mélanges

$\text{SO}^4(\text{NH}^4)^2$ + peptone
id. + NO^3K

TABLEAU 101

Sulfate d'ammoniaque 0,66 %
Peptone Difco 1 %
Saccharose 5 %
PH initial. 6

Age	PH	Récolte
2	5,6	
4	3,4	0,1285
8	2,2	0,4261
10	2,3	0,3725
12	2,2	0,3606
14	2,2	0,4086
16	1,9	0,4110
18	2,15	0,3926
20	2,2	0,3965

TABLEAU 102

Sulfate d'ammoniaque 0,66 %
 NO^3K 1,01 %
Saccharose 5 %
PH initial. 4,8

Age	PH	Récolte
3	4	
4	4	
6	3,6	0,0451
8	4,2	0,0825
10	4	0,1455
12	4	0,1365
14	4	0,131
16	4	0,2506
18	4,6	0,2694
20		0,2605

Les résultats obtenus avec la peptone sont très nets et confirment ceux de BOAS. Les récoltes élevées obtenues sont dues au pouvoir tampon de la peptone qui diminue la dissociation de SO_4H^2 (voir tableau 16).

Quant au mélange sulfate d'ammoniaque + nitrate, les résultats rappellent ceux que donne le nitrate d'ammoniaque, qui contrairement à toute attente, n'est pas un bon aliment. Il n'y a pas eu l'acidification qui accompagne l'assimilation exclusive de l'ion ammoniacal. Les expériences 68 et 69, où des dosages de l'azote sous ses deux formes ont été effectués, montrent d'ailleurs chez l'*Aspergillus repens* une aptitude spéciale à consommer l'azote nitrique. La variation de *ph* fournit des renseignements du même ordre. Il convient d'insister sur cette particularité qui montre combien était exacte l'observation initiale de LAURENT. Quant aux rendements, somme toute médiocres, obtenus avec ce mélange, ou avec le nitrate d'ammoniaque, aucune explication satisfaisante ne peut, pour le moment, en être donnée.

Le cas de l'aspartate d'ammoniaque, mélange d'azote aminé et d'azote ammoniacal, est du même ordre (Tableau 77). La mucédinée consomme d'abord uniquement l'azote ammoniacal. L'attaque de l'azote aminé ne commence qu'au 8^e jour. Le renversement de la réaction se produit à ce moment. On assiste alors, la somme azote aminé + azote ammoniacal restant à peu près constante, à une transformation progressive de l'azote aminé en azote ammoniacal. Cette culture démontre donc la consommation par préférence de l'azote ammoniacal et la transformation... diastasique ? par un mycélium âgé, de l'azote aminé. Si l'on s'était contenté de doser l'azote sous ses deux formes, à une seule période de la culture, par exemple à la fin, on aurait conclu au contraire à la consommation presque exclusive de l'azote aminé. Cela démontre l'insuffisance de la méthode suivie par ZALEWSKI et PJUKOW.

Nous pouvons donc conclure à la consommation par préférence de l'ion ammoniacal dans un mélange : Azote ammoniacal + Azote aminé. Par contre, dans les mêmes conditions, l'azote nitrique est consommé presque aussi vite que l'ammoniacal.

3) Transformation préalable de toutes les autres formes de l'azote en azote ammoniacal.

a) *Cas des nitrates.* — La réduction préalable de l'ion nitrique des nitrates en ammoniaque est considérée depuis longtemps comme

un fait acquis. J'ai indiqué plus haut que cette opinion n'a reposé pendant longtemps que sur des expériences entachées de graves erreurs dues à la protéolyse. J'ai rappelé comment KOSTYTCHEW et TSWETKOWA, par la méthode des cultures substituées, se sont mis à l'abri de cette cause d'erreur et ont établi, conformément à l'opinion ancienne, la transformation de l'acide nitrique en acide nitreux d'abord, puis en ammoniacque. Le stade intermédiaire *nitrites* avait d'ailleurs été vu avec certitude par de nombreux auteurs, comme RITTER (144).

b) *Cas des nitrites*. — La démonstration des auteurs russes s'est appliquée également aux nitrites. Mais elle ne venait que comme confirmation d'expériences déjà anciennes, comme je viens de l'indiquer.

c) *Cas des acides aminés*. — Les travaux d'EHRlich et de ses collaborateurs, rappelés plus haut, ont clairement démontré que les acides aminés sont d'abord désaminés et que l'acide alcool formé peut, dans des cas favorables, se retrouver dans la culture. EHRlich n'a pas caractérisé l'ammoniacque qui n'apparaît que de façon transitoire, pour être engagée aussitôt dans les processus synthétiques. Dans ses cultures, examinées seulement au bout d'une évolution complète, la présence d'ammoniacque n'aurait eu d'ailleurs aucune signification. Ce corps ne sera sans doute décelé, d'une façon démonstrative, que par la méthode des cultures substituées. C'est un point sur lequel je me propose de revenir.

Cependant, dès maintenant, mes expériences ont établi que l'*Aspergillus repens* transforme progressivement tout l'azote aminé en azote ammoniacal. Ce processus est si actif que la cause d'erreur de la protéolyse est négligeable. On peut raisonnablement penser que cette désamination a commencé dès le début et qu'elle n'est visible qu'au moment où, par suite de l'arrêt de la synthèse, toute l'ammoniacque produite peut se déverser dans le milieu.

Dans un cas spécial, LIOT 1923 (98) a apporté une confirmation décisive de cette théorie. Le *Bacillus pyocyaneus* ne se développe pas sur les acides aminés dont on a neutralisé par la soude la fonction acide et en l'absence de sucre. Le développement se produit si l'on ajoute du sucre, ou si l'on débloque la fonction acide. Dans le premier cas, l'azote aminé issu de la désamination ne peut se porter sur une fonction acide pour former le sel ammoniacal nécessaire au développement ; dans le deuxième cas, la fonction acide est fournie, soit par l'acide aminé lui-même, soit par les acides issus de l'attaque du sucre. Cette démonstration remarquable ne peut pas d'ailleurs

être appliquée aux moisissures qui ne s'accommodent pas de la réaction alcaline des acides aminés dont on a salifié la fonction acide.

d) *Cas de l'urée, des amides, de la peptone.* — La transformation préalable de ces corps en ammoniacque est un fait à peu près acquis. Dans le cas de l'urée, la démonstration est faite depuis longtemps ; l'alcalinisation initiale des cultures est assez démonstrative, d'ailleurs. Pour la peptone, on se trouve ramené au cas des acides aminés. Quant aux amides, leur transformation en sel ammoniacal paraît extrêmement probable.

En résumé, la transformation préalable de tous les composés de l'azote en ammoniacque peut être considérée comme un fait définitivement acquis. La démonstration n'est pas complète pour tous les cas particuliers que nous avons envisagés ; du moins, n'avons-nous trouvé aucun fait précis contre cette hypothèse.

C'est un fait d'une grande importance physiologique et qui n'est pas spécial aux champignons inférieurs. TREBOUX 1904 (166) a montré depuis longtemps que les plantes vertes se comportent de même et tout récemment GORIS et LIOT (67) ont apporté la même démonstration pour le *Bacillus pyocyaneus*, c'est-à-dire pour un organisme appartenant à un groupe où l'azote organique passait pour indispensable.

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

1° J'ai donné une bibliographie critique des travaux sur la nutrition azotée des champignons filamenteux et sur les relations de ce processus avec la réaction des milieux.

2° J'ai étudié, pour l'*Aspergillus repens* DE BARY, la valeur alimentaire des diverses formes de l'azote : sels ammoniacaux, nitrates, acides aminés, peptone, urée, imides et oximes. Les variations de la réaction du milieu qui accompagnent leur assimilation ont été déterminées avec la nouvelle notation de l'acidité. J'ai montré l'intérêt qui s'attache à déterminer la courbe de neutralisation des milieux et à suivre les variations de leur pouvoir tampon.

3° Dans le cas des sels ammoniacaux des acides forts, l'acidification des cultures est la seule cause de la mauvaise utilisation de l'ion ammoniacal. Cette acidification est due, uniquement, à la mise en liberté de l'acide minéral.

4° Les sels ammoniacaux des acides faibles ont une valeur alimentaire élevée, toutes les fois que l'acide n'est pas toxique.

5° Le mécanisme de la toxicité des acides gras et de l'acide oxalique a été élucidé. La technique utilisée a une portée générale.

6° L'ion nitrique est assimilable presque aussi vite que l'ion ammoniacal. L'*Aspergillus repens* semble constituer à ce point de vue une exception parmi les moisissures. Cela aboutit à reprendre en considération les anciennes idées de LAURENT. Dans les milieux à base de nitrates alcalins, il y a convergence du *ph* vers une valeur moyenne et ce fait est dû à la production d'acide oxalique.

7° Les acides aminés ne donnent pas des résultats supérieurs à ceux des sels ammoniacaux ; ils sont pour la plus grande part transformés en ammoniacque. Dans un mélange, l'*Aspergillus repens* consomme d'abord l'azote ammoniacal.

8° L'assimilation de l'urée s'accompagne d'une alcalinisation des cultures qui, comme dans le cas des nitrates, est plus ou moins masquée par l'apparition de l'acide oxalique.

9° Les amides grasses, l'acétoxime sont pratiquement inassimilables. La succinimide est un assez bon aliment, après transformation en ammoniacque.

10° En l'absence de sucre, la peptone est un médiocre aliment à cause de l'alcalinisation rapide des cultures ; en partant de milieux plus acides, on améliore les rendements.

11° Dans tous les cas, l'emploi de milieux à effet tampon améliore les rendements.

12° J'ai établi les limites extrêmes de l'échelle des *ph* entre lesquelles l'*Aspergillus repens* peut germer. Cette limite peut être abaissée du côté acide, par la présence de divers toxiques, dont l'action a été expliquée. Le champignon peut réaliser une acidité plus élevée que celle qui permet la germination des spores.

13° L'*Aspergillus repens* peut produire de l'acide oxalique dans ses cultures en voie d'alcalinisation. Cet acide n'apparaît pas quand l'acidité est plus élevée que *ph* 4 à *ph* 5.

14° L'acidification des cultures est liée à la nutrition azotée et à la production d'acides organiques à partir du sucre. Leur alcalinisation est due en première ligne à la consommation des acides organiques, puis à la protéolyse. Les autres causes ne jouent que dans des cas particuliers.

15° La présence de cellules géantes a été observée chez l'*Aspergillus repens*. Leur formation n'a lieu que si le milieu est plus acide que *ph* 4.

16° Les périthèces ne peuvent évoluer qu'au contact d'un milieu moins acide que *ph* 3,6. La formation des conidies est entravée par les milieux très acides (*ph* 3). Les milieux neutres ou alcalins ont sur leur apparition une action nettement favorisante.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ABDERHALDEN (E.), et RONA (P.), 1905. Die Zusammensetzung des Eiweiss von *Aspergillus niger* bei verschiedener Stickstoffquelle. — *Zeits. f. physiol. Chemie*, 46, p. 179.
2. ABDERHALDEN (E.) et TERNUCHI (Y.), 1906. Kultur-versuche mit *Aspergillus niger* auf einigen Aminosäuren und Peptiden. — *Zeits. f. physiol. Chemie*, 47, p. 394.
3. ARMSTRONG (G.), 1921. Studies in the physiology of the fungi. XIV Sulphur nutrition. The use of thiosulphate as influenced by hydrogen-ion concentration. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 8, p. 285.
4. ARRHENIUS (O.), 1922. Hydrogen ion concentration, soil properties and growth of higher plants. — *Arkiv. Bot.*, 18, p. 1.
5. AUBEL (E.), 1920. Le pouvoir stérilisant des acides. — *C. R. Ac. Sc.* 170, p. 970.
6. AYERS (H.), and RUFF (P.), 1918. Simultaneous acid and alkaline bacterial fermentations from Dextrose and the salts of organic acids respectively. — *Jour. of Inf. Diseases*, 23, p. 188.
7. BACH (D.), 1924. Variations de la concentration des ions H au cours de l'assimilation des sels ammoniacaux d'acides forts par l'*Aspergillus repens* De Bary. — *C. R. Ac. Sc.*, 179, p. 1085.
8. BACH (D.), 1924. Sur la toxicité et la valeur alimentaire de l'acétate d'ammoniaque pour les champignons inférieurs. *C. R. Ac. Sc.*, 179, p. 108.
9. BEAUVERIE (J.), 1900. Etudes sur le polymorphisme des champignons. *Thèse Doct. Sciences. Lyon*.
10. BETTINGER et DELAVAL, 1919. Action des différents acides sur le Mucor végétal. — *Bull. Assoc. Chim. suc. distil.*, 37, p. 254.
11. BIAL (M.), 1902. Die antiseptische Funktion des H-Ions verdünnter Säuren. — *Zeits. f. physik. Chemie*, 40 p. 513.
12. BIEREMA (S.), 1909. Die Assimilation von Ammon-Nitrat-und Amid-Stickstoff durch Mikroorganismen. — *Cent. f. Bakt.*, 2 Abt., 23, p. 672.
13. BOAS (F.), 1916. Stärke-Bildung bei Schimmelpilzen. — *Bioch. Zeits.*, 78, p. 308.
14. BOAS (F.), 1917. Weitere Untersuchungen über die Bildung Stärkekähnlicher Substanzen bei Schimmelpilzen. — *Bioch. Zeits.*, 81, p. 80.
15. BOAS (F.), 1918. Weitere Untersuchungen über die Bildung löslicher Stärke bei Schimmelpilzen mit besonderer Berücksichtigung der Frage nach der Eiweiss-synthese der Schimmelpilze. *Bioch. Zeits.*, 86, p. 110.
16. BOAS (F.), 1919. Die Bildung löslicher Stärke im elektiven Stickstoffstoffwechsel. — *Ber. d. deut. Bot. Gesells.*, 37, p. 50.
17. BOAS (F.), 1919. Bemerkungen über Konidien-bildende Stoffe bei Pilzen. — *Ber. d. deut. Bot. Gesells.*, 37, p. 57.

18. BOAS (F.), 1919. Selbst-vergiftung bei *Aspergillus niger*. — *Ber. d. deut. Bot. Gesells.*, 37, p. 63.
19. BOAS (F.), 1920. Ueber die Abhängigkeit von Hefenwachstum und Hefengärung von physikalisch-chemischen Erscheinungen. — *Bioch. Zeits.*, 105, p. 193.
20. BOAS (F.), LANGKAMMER (H.) und LEBERLE (H.), 1920. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. — *Bioch. Zeits.*, 105, p. 199.
21. BOAS (F.) und LEBERLE (H.), 1918. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. — *Bioch. Zeits.*, 90, p. 78.
22. BOAS (F.) und LEBERLE (H.), 1918. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. — *Bioch. Zeits.*, 92, p. 170.
23. BOAS (F.) und LEBERLE (H.), 1919. Untersuchungen über Säurebildung bei Pilzen und Hefen. — *Bioch. Zeits.*, 95, p. 170.
24. DE BORD (G.), 1923. Certain phases of nitrogenous metabolism in bacterial cultures. — *Jour. of Bacter.*, 8, p. 7.
25. BOYLE (C.), 1924. The growth reactions of certain fungi to their staling products. — *Ann. of Botany*, 38, p. 113.
26. BREFELD (O.), 1873. *Mucor racemosus* und Hefe. — *Flora*.
27. BRENNER (W.), 1914. Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. — *Centr. f. Bakt.*, 2 Abt., 40, p. 555.
28. BRIGHTMAN (C.), MEACHAM (M.), und ACREE (S.), 1920. A spectrophotometric study of the « salt effects » of phosphate upon the color of phenol-sulfone-phthaleine salts and some biological applications. — *Journ. Bacter.*, 5, p. 169.
29. BROOKS (C.), 1906. Temperature and toxic action. — *Bot. Gazette*, 42, p. 359.
30. BUTKEWITSCH (W.), 1903. Umwandlung der Eiweiss-stoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. — *Jahrb. f. wiss. Botanick*, 38, p. 147.
31. BUTKEWITSCH (W.), 1922. Ueber die Bildung der Oxalsäure und des Ammoniaks in den Kulturen von *Aspergillus niger* auf Peptone. — *Bioch. Zeits.*, 129, p. 445.
32. BUTKEWITSCH (W.), 1922. Die Ausnutzung des Peptons als Kohlenstoffquelle durch die *Citromyces*-Arten. — *Bioch. Zeits.*, 129, p. 455.
33. BUTKEWITSCH (W.), 1922. Ueber die Bildung und Anhäufung der Oxalsäure in den *Citromyces* Kulturen auf den Salzen der organischen Säuren. — *Bioch. Zeits.*, 129, p. 464.
34. CLARK (J.-F.), 1899. On the toxic effect of deleterious agents on the germination and development of certain filamentous fungi. — *Bot. Gazette*, 28, pp. 289 et 378.
35. CLARK (M.), 1915. The final hydrogen ion concentration of cultures of *Bacillus coli*. — *Journ. of biol. chem.*, 22, p. 87.
36. CLARK (M.), 1922. The determination of Hydrogen ions. — *Second Edition, Baltimore*.
37. CLARK (M.) et LUBS (M.), 1917. The colorimetric determination of hydrogen ion concentration, and its application in Bacteriology. — *Jour. Bacter.*, 2, pp. 1, 109, 191.
38. CLARK (M.), et LUBS (M.), 1917. Improved chemical methods for

- differentiating Bacteria of the *Coli aerogenes* family. — *Journ. of biol. chem.*, 30, p. 209.
39. CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN, 1924. Concentrations optima et concentrations limites en ions hydrogène des cultures microbiennes. Variations produites par les microbes vers les concentrations optima. — *C. R. Ac. Sc.*, 178, p. 1638.
40. COHEN (B.) and CLARK (M.), 1919. The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. — *Jour. Bacter.*, 4, p. 409.
41. COHN (E.) und CZAPEK (F.), 1906. Beobachtungen über Bildung von Säuren und Alkali in künstlichen Nährsubstraten von Schimmelpilzen. — *Hofmeister Beiträge*, 8, p. 302.
42. COLE (A.), 1922. Effect of variations in hydrogen ion concentration on the growth of seedlings. — *Thesis Univ., Mo.*
43. COOLEY (J.), 1924. A study of the physiological relations of *Sclerotinia cinerea* (Bon) Schröter. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 1, p. 291.
44. CURRIE (J.), 1917. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. — *Journ. of biol. chem.*, 31, p. 15.
45. CZAPEK (F.), 1901. Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Pflanzen. — *Hofmeisters Beiträge*, 1, p. 538, et 2, p. 557.
46. CZAPEK (F.), 1901. Zur Kenntniss der Stickstoffversorgung und Eiweissbildung bei *Aspergillus niger*. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 19, p. 137.
47. DERNBY (K.), 1917. Studien über die proteolytischen Enzyme der Hefe und ihre Beziehung zu der Autolyse. — *Bioch. Zeits.*, 84, p. 197.
48. DERNBY (K.), 1921. La concentration optima en ions H favorisant le développement de certains microorganismes. — *Ann. Ins. Pasteur*, 35, p. 277.
49. DUCLAUX (J.), 1864. Sur la fermentation alcoolique. — *C. R. Ac. Sc.*, 58, p. 1114.
50. DOX (A.) and MAYNARD (L.), 1912. Autolysis of mold cultures. — *Jour. of biol. chem.*, 12 p. 227.
51. DOX (A.) und NEIDIG (R.), 1913. Enzymatische Spaltung von Hippursäure durch Schimmelpilze. — *Zeits. f. physiol. Chemie*, 85, p. 68.
52. DUGGAR (B.-M.), 1901. Pysiological studies with reference to the germination of certain fungous spores. — *Bot. Gazette*, 31, p. 38.
53. DUGGAR (B.), SEVERY (J.) and SCHMITZ (H.), 1917. The growth of certain fungi in plant decoctions ; preliminary account. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 4, p. 165.
54. EASTMAN (E., D.) and HILDEBRAND (J.), 1914. The preparation of « neutral » ammonium citrate. — *Journ. Ind. Eng. Chem.*, 6, p. 577.
55. EHRLICH (F.), 1911. Ueber die Bildung des Plasmaciweisses bei Hefen und Schimmelpilzen. — *Bioch. Zeits.*, 36, p. 477.
56. EHRLICH (F.), 1916. Ueber den biochemischen Abbau secundärer und tertiärer Amine durch Hefen und Schimmelpilze. — *Bioch. Zeits.*, 75, p. 417.
57. EHRLICH (F.), 1917. Ueber die Vegetation von Hefen und Schim-

- melpilzen auf heterocyklischen Stickstoffverbindungen und Alkaloiden. — *Bioch. Zeits.*, 79, p. 152.
58. EHRLICH (F.) und JACOBSEN (K.), 1911. Ueber die Umwandlung von Aminosäuren durch Schimmelpilze. — *Ber. d. deut. chem. Gesell.*, 44, p. 888.
59. EHRLICH (F.) und PITSCHIMUKA (P.), 1912. Ueberführung von Aminen in Alkohole durch Hefe und Schimmelpilze. — *Ber. d. deut. chem. Gesell.*, 45, p. 1006.
60. ELFING (F.), 1918-1919. Ueber die Bildung organischer Säuren durch *Aspergillus niger*. — *Öfver. af Finska Vetensk. Soc. Förhandl.*, 61.
61. EMMERLING (O.), 1902. Aminosäuren als Nährstoffe für niedere Pilze. — *Ber. d. deut. chem. Gesell.*, 35, p. 2289.
62. EMMERLING (O.), 1901. Oxalsäurebildung durch Schimmelpilze. — *Cent. f. Bakt.*, 2 Abt., 10, p. 273.
63. EZEKIEL (U.), 1923. Hydrogen ion concentration and development of *Sclerotinia Apothecia*. — *Science* (166), 31 août.
64. FISCHER (A.), 1923. Wasserstoff- und Hydroxylionen als Keimungsreize. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 25, p. 108.
65. GAYNEY, 1918. Soil reaction and the growth of *Azotobacter*. — *Jour. Agri. Res.*, 15, p. 265.
66. GILLESPIE, 1918. The growth of the potato scab organism at various hydrogen ion concentrations as related to the comparative freedom of acid soils from the potato scab. — *Phytopathology*, 8, p. 257.
67. GORIS (A.) et LIOT (A.), 1921. Observations sur la culture du *Bacille pyocyaneus* sur milieux artificiels définis. — *C. R. Ac. Sc.*, 172, p. 1622.
68. GORIS (A.) et COSTY (R.), 1923. Urée et uréase chez les champignons inférieurs. — *Bull. Scien. Pharm.*, 30, p. 65.
69. GOUPIÉ (R.), 1911. Recherches sur l'*Amylomyces* (Rhizopus) Rouxi. *C. R. Ac. Sc.*, 153, p. 1172.
70. HAGEM (O.), 1910. Untersuchungen über norwegischen Mucorineen. *Skript. utg. af Vidensk-Selsk. i. Christiania*, 1910, *Math. Naturw. Kl.*, 4, p. 26.
71. HARDY (W.-B.), 1900. A preliminary investigation of the conditions which determine the stability of irreversible hydrosols. — *Procee. Roy. Soc.*, 65, p. 110.
72. HIXON (R.), 1920. The effect of the reaction of a nutrient solution on the germination and the first stages of plant growth. — *Medd. Vetenskapsak. Nobelinstitut*, 4, p. 1.
73. HOPKINS (E.), 1921. Growth and germination of *Gibberella Saubinetii* at varying hydrogen ion concentrations. — *Phytopathology*, 8, p. 257.
74. HOPKINS (E.), 1922. Hydrogen ion concentration in its relation to the Wheat scab. — *Amer. Journ. of Botany*, 9, p. 159.
75. HURTWITZ (S.), MEYER (K.) and OSTENBERG (Z.), 1915. On a colorimetric method of adjusting bacteriological culture media to any optimum hydrogen ion concentration. — *Procee. Soc. Exper. Biol. Med.*, 13, p. 24.
76. JAVILLIER (M.), 1912. Influence exercée par le zinc sur l'utilisation

- par l'*Aspergillus niger* de ses éléments hydrocarbonés, azotés et minéraux. Définition nouvelle des coefficients d'utilité spécifique des éléments. — *Bull. Scien. Pharm.*, 19, p. 513.
77. JOACHIMOGLU (G.), 1923. Ueber den Einfluss der Wasserstoffionenkonzentrationen auf die antiseptische Wirkung des Sublimats. — *Bioch. Zeits.*, 134, p. 489.
78. JOHANNESSEN (F.), 1912. Einfluss organischer Säuren auf die Hefe-Gährung. — *Bioch. Zeits.*, 47, p. 97.
79. KAHLENBERG (L.) et TRUE (R.), 1896. On the toxic action of dissolved salts and their electrolytic dissociation. — *Bot. Gazette*, 22, p. 81.
80. KARRER (J.), 1921. Studies in the physiology of fungi. XIII. The effect of hydrogen ion concentration upon the accumulation and activation of amylase produced by certain fungi. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 8, p. 63.
81. KIESEL (A.), 1913. Sur l'action de divers acides et sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger*. — *Ann. Ins. Pasteur*, 27, p. 391.
82. KIESEL (A.), 1913. Changements morphologiques de l'*Aspergillus niger* en présence de divers acides et sels acides. — *Ibid.*, 27, p. 481.
83. KLEBS (G.), 1896. Die Bedingungen der Fortpflanzung einigen Algen und Pilzen. *Iena*.
84. KLOTZ (J.), 1923. Some aspects of nitrogenous metabolism in fungi. *Ann. Miss. bot. Gard.*, 10, p. 1.
85. KOLTHOFF (I.), 1922. L'erreur de sel des indicateurs colorants. — *Recueil trav. chim.*, 41, p. 54.
86. KOSSOWICZ (A.), 1912. Die Zersetzung von Harnstoff, Harnsäure, Hippursäure und Glykokolle durch Schimmelpilze. — *Zeits. f. Gährungsphysiol.*, 1, p. 60, et 2, p. 81.
87. KOSSOWICZ (A.), 1912. Die Assimilation von Guanin und Guanidin durch Schimmelpilze. — *Zeits. f. Gährungsphysiol.*, 2, p. 84.
88. KOSSOWICZ (A.), 1914. Zur Kenntniss der Assimilation von Kohlenstoff und Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. — *Bioch. Zeits.*, 67, p. 391.
89. KOSSOWICZ (A.), 1914. Ueber das Verhalten von Hefen und Schimmelpilzen zu Nitraten. — *Bioch. Zeits.*, 67, p. 400.
90. KOSTYTCHEW (S.) und TSWETKOWA (E.), 1920. Ueber die Verarbeitung der Nitrate in organische Stickstoffverbindungen durch Schimmelpilze. — *Zeits. f. physiol. Chemie*, 111, p. 171.
91. KÜNTSMANN, 1895. Ueber das Verhältniss zwischen Pilzernten und verbrauchten Nahrung. — *Inaug. Dissert.*, Leipzig.
92. KÜSTER (E.), 1908. Keimung und Entwicklung von Schimmelpilzen in gebrauchten Nährlösungen. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 26, p. 246.
93. LAURENT (E.), 1888. Recherches sur le polymorphisme du *Cladosporium herbarum*. — *Ann. Ins. Pasteur*, 2, p. 581.
94. LAURENT (E.), 1889. Recherches sur la valeur comparée des nitrates et des sels ammoniacaux comme aliment de la levure de bière et de quelques autres plantes. — *Ann. Ins. Pasteur*, 3, p. 362.
95. LEHMAN (G.), 1922. Die Messung der Pufferung. — *Bioch. Zeits.*, 133, p. 30.

96. LINDFORS (T.), 1924. Einige Kultureversuche mit *Fusarium* Arten, in Nährlösungen von verschiedenen Wasserstoffionenkonzentration. — *Bot. Notizer*, p. 161.
97. LINOSSIER (G.) et ROUX (G.), 1890. Sur la nutrition du champignon du muguet. — *C. R. Ac. Sc.*, 110, p. 335.
98. LIOT (A.), 1923. Sur la culture du bacille pyocyannique sur milieux chiniquement définis. — *Thèse Pharmacien supérieur*. Paris.
99. LLOYD (F.), 1918. The effect of acids and alkalis on the growth of the protoplasm in pollen tubes. — *Mem. Torr. Bot. Club*, 17, p. 84.
100. LOEB (J.), 1924. Les protéines. — Traduction française, *Paris*.
101. LOEW (O.), 1890. Verhalten niederer Pilze gegen anorganische Stickstoffverbindungen. — *Biol. Central.*, 10, p. 577.
102. LOEW (O.), 1904. Zur Kenntniss der Eiweissbildung bei den Pilzen. — *Hofmeister Beiträge*, 4, p. 247.
103. LUTMAN (B.) et CUNNINGHAM (A.), 1914. Potato scab. — *Bull.* 84, *Agric. Exper. Station*.
104. LUTZ (L.), 1898. Recherches sur la nutrition des végétaux à l'aide de substances azotées de nature organique. — *Ann. Scien. nat. Bot.*, série 8, t. 7, p. 1.
105. LUTZ (L.), 1905. Sur l'assimilabilité comparée des sels ammoniacaux, des amines, des amides et des nitriles. — *C. R. Ac. Sc.*, 140, p. 665.
106. LUTZ (O.), 1909. Ueber den Einfluss gebrauchter Nährlösungen auf die Keimung und Entwicklung einiger Schimmelpilze. — *Ann. Mycol.*, 7, p. 91.
107. MALEITANO (G.), 1900. La protéolyse chez l'*Aspergillus niger*. — *Ann. Ins. Pasteur*, 14, p. 60.
108. MANGIN (M.), 1909. Qu'est-ce que l'*Aspergillus glaucus* ? — *Ann. Scien. nat. Bot.*, série 9, t. 10, p. 303.
109. MAZÉ (P.), 1909. Note sur la production d'acide citrique par les *Citromyces* Wehner. — *Ann. Ins. Pasteur*, 23, p. 830.
110. MEACHAM (M.), 1918. Note upon the hydrogen ion concentration necessary to inhibit the growth of four wood-destroying fungi. — *Science*, n. s. 48, p. 400.
111. MEACHAM (M.), HOPFIELD (J.) and ACREE (S.), 1920. — The relative effect of phosphate-acetate and of phosphate-phtalate buffer mixture upon the growth of *Endothia parasitica* on malt extract and corn meal media. — *Jour. Bacter.*, 1920, 5, p. 305.
112. MEILLÈRE (G.) et DE SAINT-RAT, 1922. Dosage de l'azote total. Dispositif pour recueillir l'ammoniaque. Application au dosage des albumines du lait. — *Jour. Pharm. Chimie*, série 7, 22, p. 100.
113. MESTREZAT (W.), 1919. Formol-titration des acides aminés en solution aqueuse ou dans l'urine. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1, p. 107.
114. MICHAELIS (L.), 1922. Die Wasserstoffionenkonzentration. — *Zweite Auflage*, Berlin.
115. MOLLIARD (M.), 1919. Production d'acide citrique par le *Sterigmatocystis nigra*. — *C. R. Ac. Sc.*, 168, p. 360.
116. MOLLIARD (M.), 1920. Influence de la réaction du milieu sur la respiration du *Sterigmatocystis nigra*. — *C. R. Soc. Biol.*, 83, p. 50.

117. MOLLIARD (M.), 1920. Sur les caractères présentés par le *Sterigmatocystis nigra* en présence d'une dose réduite de phosphore. — *C. R. Soc. Biol.*, 83, p. 479.
118. MOLLIARD (M.), 1922. Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra*. — *C. R. Ac. Sc.*, 174, p. 881.
119. MOLLIARD (M.), 1924. Influence de la nature des sucres sur la formation d'acides organiques par le *Sterigmatocystis nigra* sur milieux déséquilibrés. — *C. R. Soc. Biol.*, 90, p. 1395.
120. MOLLIARD (M.), 1924. Retentissement de la composition minérale du milieu nutritif sur la structure du *Sterigmatocystis nigra*. — *C. R. Ac. Sc.*, 178, p. 1865.
121. MOLLIARD (M.), 1923. La nutrition de la plante. — Paris, Doin, p. 210.
122. MOORE (E.), 1924. The physiology of *Fusarium cæruleum*. — *Ann. of Botany*, 38, p. 137.
123. NÄGELI (C.), 1881. Untersuchungen über niedere Pilze. — *Bot. Mitteil. v. Nägeli*, 3, p. 395.
124. NÄSSLUNG (C.) und DERNBY (K.), 1923. Untersuchungen über einige physiologische Eigenschaften der Strahlenpilze. — *Bioch. Zeits.*, 138, p. 497.
125. NIKITINSKY (J.), 1904. Ueber die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. — *Jahr. f. wiss. Botan.*, 40, p. 1.
126. OLSEN (C.), 1921. Studies over jordbundens brintionkonzentration og dens betydning for vegetationen, saerlig for plantefordelingen i naturen. — *Midd. Carlsberglaboratorium*.
127. OVERTON (E.), Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nervenphysiologie. — *Arch. f. d. ges. Physiol.*, 92, p. 115.
128. PAUL (Th.), BIRSTEIN (G.) und REUTZ (A.), 1910. Beiträge zur Kinetik der Giftwirkung von gelösten Stoffen. — *Bioch. Zeits.*, 29, p. 202.
129. PELTIER (G.), 1912. A consideration of the physiology and life history of a parasitic *Botrytis* on pepper and lettuce. *Rep. Miss. bot. Gard.*, 23, p. 74.
130. PFEFFER (W.), 1895. Ueber Elektion organischer Nährstoffe. — *Jahr. f. wiss. Botan.*, 28, p. 205.
131. PRATT (C.), 1924. Staling of fungal cultures. I General and chemical investigations of Staling by *Fusarium*. — *Ann. of Botany*, 38, p. 563.
132. PRATT (C.), 1924. The staling of fungal cultures. II. The alkaline metabolic products and their effect on the growth of fungal spores. — *Ann. of Botany*, 38, p. 599.
133. PURIEWITSCH (K.), 1912. Untersuchungen über die Eiweiss-synthese bei niederen Pflanzen. — *Bioch. Zeits.*, 38, p. 1.
134. RACIBORSKI (M.), 1896. Ueber den Einfluss äusserer Bedingungen auf die Wachstumsweise des *Basidiobolus ranarum*. — *Flora*, 82, p. 107.
135. RACIBORSKI (M.), 1900. Ueber die Assimilation der Stickstoffverbindungen durch Pilze. — *Bull. Ac. Sc. Cracovie, Clas. Sc. Mat. et Natur.*, p. 747.
136. RAISTRICK (H.) and CLARK (A.), 1919. On the mechanism of oxalic acid production by *Aspergillus niger*. — *Bioch. Jour.*, 13, p. 329.

137. RAULIN (P.), 1869. Etudes chimiques sur la végétation. — *Ann. Sc. natur.*, série 5, t. 2, p. 93.
138. RAVIN (P.), 1913. Nutrition carbonée des plantes à l'aide des acides organiques libres ou combinés. — *Ann. Sc. natur. Bot.*, série 9, t. 18, p. 289.
139. RAYBAUD (L.), 1913. Influence du milieu sur les champignons inférieurs. — *Rev. gén. botan.*, 24, p. 392.
140. REED (H.) and GRISSOM (Th.), 1915. The development of alkalinity in *Glomerella* cultures. — *Journ. of biol. chem.*, 21 p. 159.
141. REES, 1870. Botanische Untersuchungen über die Alkoholgährungspilze.
142. REICHEL (J.), 1911. Ueber das Verhalten von *Penicillium* gegenüber der Essigsäure und ihren Salzen. — *Bioch. Zeits.*, 30, p. 152.
143. RITTER (G.), 1909. Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 27, p. 582.
144. RITTER (G.), 1911. Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 29, p. 570.
145. RITTER (G.), 1912. Die giftige und formative Wirkung der Säuren auf die Mucoraceen und ihre Beziehung zur Mucorhefebildung. — *Jahr. f. wiss. Botan.*, 52, p. 351.
146. RITTER (G.), 1914. Ammonitrat und freie Salpetersäure als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. — *Bioch. Zeits.*, 60, p. 370.
147. ROBBINS (W.), 1923. An isoelectric point for plant tissue and its significance. — *Amer. jour. of Bot.*, 10, p. 412.
148. ROBBINS (W.), 1924. Isoelectric point for the mycelium of fungi. — *Journ. of gen. Physiol.*, 6, p. 259.
149. ROSENBLATT (M.) et ROSENBAUD (M.), 1909. Sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la fermentation alcoolique. — *C. R. Ac. Sc.*, 149, p. 309.
150. SALTER (R.) and MAC ILVAINE (T.), 1920. Effect of the reaction of the solution on the germination of seeds and growth of seedlings. — *Jour. Agri. Res.*, 19, p. 73.
151. SAUTON (B.), 1913. Sur la sporulation de l'*Aspergillus niger* et de l'*Aspergillus fumigatus*. — *Ann. Ins. Pasteur*, 27, p. 328.
152. SCHLOESING (Th.) et MUNTZ (A.), 1878. Recherches sur la nitrification par les ferments organisés. — *C. R. Ac. Sc.*, 86, p. 892.
153. SCHMITZ (H.), 1919. Studies in the physiology of fungi. The relation of bacteria to cellulose fermentation induced by fungi, with special reference to the decay of wood. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 6, p. 93.
154. SCHMITZ (M.) and ZELLER (S.), 1919. Enzym action in certain fungi. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 6, p. 193.
155. SCUDDER (H.), 1914. The electrical conductivity and ionization constants of organic compounds. — *New-York*.
156. SHIBATA (K.), 1904. Ueber das Vorkommen von Amide spaltenden Enzymen bei Pilzen. — *Hofmeisters Beitrage*, 5, p. 384.
157. SIERAKOWSKI (S.), 1923. Variations et nature des concentrations en ions H des cultures bactériennes. — *C. R. Soc. Biol.*, 89, p. 1371.
158. STEINBERG (R.), 1919. A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*. — *Amer. Jour. of Bot.*, 6, p. 330.

159. STEVENS (F.), 1898. The effect of aqueous solutions upon the germination of fungus spores. — *Bot. Gazette*, 26, p. 377.
160. STOHL (A.), 1922. The effect of hydrogen ion concentration upon the determination of Calcium. — *Journ. of biol. chem.*, 50, p. 527.
161. TANRET (C.), 1896. Action du nitrate d'ammoniaque sur l'*Aspergillus*. — *C R. Ac. Sc.*, 123, p. 948.
162. TANRET (C.), 1896. Action des nitrate, sulfate, chlorhydrate et phosphate d'ammoniaque sur l'*Aspergillus niger*. — *Bull. Soc. chim.*, 17, p. 914.
163. TERROINE (E.), WURMSER (R.), 1922. L'énergie de croissance. Le développement de l'*Aspergillus niger*. — *Bull. Soc. chim. biol.*, 4, p. 519.
164. TERROINE (E.), WURMSER (R.) et MONTANÉ (J.), 1922. Influence de la composition des milieux nutritifs sur la composition de l'*Aspergillus niger*. — *Bull. Soc. chim. biol.*, 4, p. 623.
165. TETSU SAKAMURA, 1924. Ueber die Kultur von *Aspergillus niger* mit besonderer Rücksicht auf das Puffervermögen der Nährlösung. — *Jour. of coll. of Agric., Hokkaido Imper. Univer.*, 14, p. 65.
166. TRÉBOUX (O.), 1904. Zur Stickstoffnahrung der grünen Pflanzen. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 22, p. 570.
167. VAN SLYKE (D.) and PALMER (W.), 1920. The titration of organic acids in urin. — *Jour. of biol. chem.*, 41, p. 567.
168. VORBRÖDT, 1919. Elaboration de l'azote et du phosphore dans le mycelium d'*Aspergillus niger*. — *Bull. Ac. pol. Sc. et let., Classe Sc. Math. et nat., série B*.
169. WAKSMAN (S.), 1920. Studies on the metabolism of *Actinomyces*. 3. Nitrogen metabolism. — *Journ. Bacter.*, 5, p. 1.
170. WAKSMAN (S.) and JOFFE (J.), 1920. Studies in the metabolism of *Actinomyces*. 4. Changes in reaction as a result of the growth of *Actinomyces* upon culture media. — *Jour. Bact.*, 5, p. 31.
171. WATERMAN (U.), 1913. Ueber einige Faktoren welche die Entwicklung von *Penicillium glaucum* beeinflussen. — *Cent. f. Bakt.*, 2 Abt., 42, p. 639.
172. WEBB (R.), 1919. Germination of spores of certain fungi in relation to hydrogen ion concentration. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 6, p. 201 et 8, p. 283.
173. WEHMER (C.), 1891. Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Schimmelpilze. — *Bot. Zeitung*, 49, p. 233 et suiv.
174. WEHMER (C.), 1913. Uebergang älterer Vegetationen von *Aspergillus fumigatus* in Riesenzellen unter Wirkung angehäufte Säure. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 31, p. 257.
175. WEHMER (C.), 1913. Selbstvergiftung in *Penicillium* Kulturen als folge der Stickstoffernährung. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 31, p. 210.
176. WEHMER (C.), 1914. Der Gang der Acidität in Kulturen von *Aspergillus niger* in wechselnder Stickstoffquelle. — *Bioch. Zeits.*, 59, p. 63.
177. WERNER, 1898. Die Bedingungen der Konidienbildung bei einigen Pilzen. — D'après Ritter, 145.

178. WOLF (F.) and SCHUNK (J.), 1921. Tolerance to acids of certain bacterial plant pathogenes. — *Phytopathology*, 11, p. 244.
179. WOLPERT, 1924. Studies in the physiology of fungi. XVII. The growth of certain wood destroying fungi in relation to the H ion concentration of the media. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 11, p. 43.
180. ZALEWSKI (W.) und ISRAILSKY (W.), 1914. Ueber den Eiweissaufbau in der Hefe. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 32, p. 472.
181. ZALEWSKI (W.) und PJUKOW (O.), 1914. Ueber Elektion der Stickstoffverbindungen durch *Aspergillus niger*. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 32, p. 479.
182. ZELLER (S.), 1916. *Lenzites Saepiaria* Fries with special reference to enzyme activity. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 3, p. 439.
183. ZELLER (S.), SCHMITZ (H.) and DUGGAR (B.), 1919. Growth of wood destroying fungi on liquid media. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 6, p. 137.

INTRODUCTION.	5
HISTORIQUE	11
LES MÉTHODES D'ÉTUDE	29
1 ^o L'organisme étudié	29
2 ^o Le milieu de culture.	30
3 ^o Les conditions de culture.	36
4 ^o Recherches chimiques sur la culture et le liquide de culture	37
PARTIE EXPÉRIMENTALE.	41
PREMIÈRE PARTIE. — Influence de la pression osmotique	41
DEUXIÈME PARTIE. — Assimilation de l'ion ammoniacal.	47
CHAPITRE I. — Sels ammoniacaux d'acides minéraux forts	48
Chlorhydrate d'ammoniaque	48
Sulfate d'ammoniaque.	56
CHAPITRE II. — Sels ammoniacaux des acides minéraux faibles	62
CHAPITRE III. — Sels ammoniacaux des acides de la série acétique.	67
CHAPITRE IV. — Sels ammoniacaux des acides de la série oxalique	80
CHAPITRE V. — Sels ammoniacaux des acides alcools	96
TROISIÈME PARTIE. — Assimilation de l'ion nitrique	109
Nitrate de potasse	110
Nitrate d'ammoniaque	117
QUATRIÈME PARTIE. — Assimilation des combinaisons organiques de l'azote.	121
CHAPITRE I. — Assimilation de l'azote aminé des amino-acides	121
CHAPITRE II. — Assimilation de l'azote amidé des amides	138
CHAPITRE III. — Assimilation de l'urée.	142
CHAPITRE IV. — Fonctions azotées diverses	145
CHAPITRE V. — Assimilation de la peptone	147

CONCLUSIONS

PREMIÈRE PARTIE. — Influence de la réaction du milieu sur le champignon.	155
DEUXIÈME PARTIE. — Changements de réaction produits dans le milieu par l'utilisation des diverses formes de l'azote.	163
1 ^o Phénomènes d'acidification	163
2 ^o Phénomènes d'alcalinisation	167
TROISIÈME PARTIE. — Valeur alimentaire des diverses formes de l'azote.	175
1 ^o L'amino-acide, forme obligatoire de l'assimilation de l'azote	176
2 ^o L'ammoniaque, forme obligatoire de l'assimilation de l'azote	178
RÉSUMÉ GÉNÉRAL.	183
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.	185

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

A quelles conditions un milieu nutritif (*cas des végétaux*) ou un régime alimentaire (*cas des animaux*) est-il physiologiquement équilibré ?

Nutrition azotée des Levures.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 23 octobre 1925,

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

M. MOLLIARD.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

P. LAPIE.

